

Aus der Klinik für Innere Medizin

Abteilung für Pneumologie

Direktor: Herr Prof. Dr. C. Vogelmeier

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg



Auswirkung der Nitrierung von Allergenen und von nitriertem Polytyrosin
auf die Entwicklung einer akut allergischen Atemwegsreaktion
am Mausmodell

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Dorothee Niemeyer

aus Bielefeld

Marburg, 2012

Angenommen vom Fachbereich Medizin

der Philipps-Universität Marburg am:

29.10.2012

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Herr Prof. Dr. B. Müller

1. Korreferent: Frau PD Dr. Morin

Meinen Eltern

in Liebe und Dankbarkeit

Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	Hintergrund	1
1.1.1	Charakterisierung der Erkrankung Asthma bronchiale.....	2
1.1.1.1	Klinisches Erscheinungsbild	2
1.1.1.2	Physiologie	2
1.1.2	Risikofaktoren und Hypothesen zur Entstehung des Asthmas	4
1.1.2.1	Epidemiologische Forschung zum Thema Umwelthypothese	6
1.1.2.2	Tierexperimentelle Studien zum Thema Umwelthypothese	8
1.1.3	Oxidativer und nitrosativer Stress	9
1.1.3.1	Proteinnitrierung	10
1.1.3.1.1	Proteinnitrierung - Ursache für refraktäre Asthmaerkrankungen? ..	11
1.1.3.1.2	Proteinnitrierung außerhalb des Körpers.....	11
1.2	Eigene Vorgehensweise	12
1.2.1	Arbeitshypothesen	12
1.2.2	Zielsetzung	14
2	Materialien	15
2.1	Geräte	15
2.2	Chemikalien	17
2.2.1	Einzelsubstanzen.....	17
2.2.2	KITs	20
2.2.3	Enzyme	20
2.2.4	Gelmarker	20
2.2.5	Antikörper	21
2.2.6	Oligonukleotide für die RT-qPCR	22
2.3	Herstellungsrezepte benötigter Puffer und Lösungen	23
2.3.1	Narkoselösung für die Lungenfunktionsmessung	23
2.3.2	Lösungen für die Typ-II-Pneumozyten Isolation	23
2.3.3	Lösungen für die immunhistochemische Färbung	24
2.3.4	Lösungen für die SDS-Polyacrylamid Gele	25
2.3.5	Lösungen für die Gel- Elektrophorese	25
2.3.6	Lösungen für den Western-Blot	26
2.3.7	Lösungen für die Gelfärbung	26
3	Methoden	28

3.1 Versuchstiere und Haltung	28
3.1.1 Erzeugung einer akut-allergischen Atemwegsreaktion	29
3.2.1 Substanzen, Behandlungsgruppen und Versuchsschemata	29
3.2.2 Sensibilisierung.....	31
3.2.3 Provokation	31
3.3 Lungenfunktionsmessung	32
3.4 Typ-II-Zell Isolierung, Gewinnung der Lavage.....	33
3.4.1 Zellzählung	35
3.5 Verarbeitung der broncho-alveolären Lavage (BAL)	36
3.5.1 Zytospinpräparation.....	36
3.5.2 Färbung nach Pappenheim	37
3.5.3 Proteinkonzentrationsbestimmung der zellfreien BAL	37
3.6 Herstellung histologischer und immunhistochemischer Präparate	38
3.6.1 Entparaffinierung, Rehydrierung und Hämalaun-Eosin (HE)-Färbung von Gewebeschnitten.....	38
3.6.2 Immunhistochemische Detektion	39
3.7 RNA- und Proteingewinnung aus den Typ-II-Pneumozyten.....	40
3.7.1 RNA- und Proteinaufreinigung	40
3.7.2 Protein Aufreinigung	41
3.8 Reinheitsgrad- und Konzentrationsmessung der RNA-Proben.....	42
3.9 Konzentrationsbestimmung des Typ-II-Zell Proteins	42
3.10 Western Blot der aufgereinigten Typ-II-Zell Proteine	43
3.10.1 Gel Herstellung.....	43
3.10.2 Gelelektrophorese	44
3.10.3 Western Blot	44
3.11 cDNA-Synthese.....	46
3.12 Quantitative Analyse der Genexpression mittels RT-qPCR.....	47
3.12.1 Durchführung der quantitativen Real Time-PCR (RT-qPCR)	48
3.12.2 Berechnung nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode	48
3.13 Statistische Auswertung	49
4 Ergebnisse.....	50
4.1 Lungenfunktionsmessung an C57BL6- und BALB/c-Tieren	50
4.2 Untersuchungen an C57BL6-Tieren.....	50
4.2.1 Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit (BAL)	50
4.2.1.1 Zytospinpräparate	50

4.2.1.2 Proteinkonzentration der zellfreien Lavage	55
4.2.3 Analyse der Hämatoxylin-Eosin gefärbten Gewebeschnitte	55
4.2.4 Gesamtproteingehalt der Typ-II-Zellen	60
4.2.5 Detektion antioxidativer Enzyme	60
4.2.5.1 Detektionen auf Glutathionreduktase (GR)	61
4.2.5.1.1 Immunhistologische Detektion der GR.....	61
4.2.5.1.2 Enzymnachweis der GR mittels Western Blot	63
4.2.5.1.3 Genexpression der GR	64
4.2.5.2 Detektionen auf Glutathionperoxidase 3 (GPX3)	64
4.2.5.2.1 Immunhistologische Detektion der GPX3.....	64
4.2.5.2.2 Enzymnachweis der GPX3 mittels Westernblot.....	66
4.2.5.2.3 Genexpression der GPX3	67
4.2.5.3 Detektion auf Glutathionperoxidase 4 (GPX4)	68
4.2.5.3.1 Immunhistologische Detektion der GPX4.....	68
4.2.5.3.2 Genexpression der GPX4	68
4.3 Versuche an BALB/c-Tieren	70
4.3.1 Zytospinpräparate der bronchoalveolären Lavage	70
4.3.2 Proteinkonzentration der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit	74
4.3.3 Histologische Veränderungen.....	74
4.3.4 Proteingehalt der Typ-II-Pneumozyten.....	77
4.3.5 Detektion antioxidativer Enzyme	78
4.3.5.1 Detektion der Glutathionreduktase	78
4.3.5.1.1 Immunhistologische Detektion der GR.....	78
4.3.5.1.2 Enzymnachweis der GR mittels Western Blot	80
4.3.5.1.3 Genexpression der GR	81
4.3.5.2 Detektion auf Glutathionperoxidase 3.....	82
4.3.5.2.1 Immunhistologische Detektion der GPX3.....	82
4.3.5.2.2 Enzymnachweis der GPX3 mittels Western Blot.....	83
4.3.5.2.3 Genexpression der GPX3	84
4.3.5.3 Detektion auf Glutathionperoxidase 4.....	84
4.3.5.3.1 Immunhistologische Detektion der GPX4.....	84
4.3.5.3.2 Genexpression der GPX4	85
5 Diskussion.....	86
5.1 Einführung und Hypothesennennung	86
5.1.1 Die pulmonalen Entzündungsreaktion am Mausmodell	87

5.2 Lungenfunktionsmessungen	87
5.3 Studien an C57BL6-Tieren	89
5.3.1 Die Lavage: Zytospinpräparation und Proteinkonzentration	89
5.3.2 Histologische Veränderungen.....	91
5.3.3 Enzym-Detektion und -Expression in Typ-II-Zellen.....	92
5.4 Studien an BALB/c-Tieren und Vergleich mit C57BL6-Stamm.....	94
5.4.1 Bronchoalveoläre Lavage	94
5.4.2 Histologische Veränderungen.....	95
5.4.3 Enzym-Detektion und Expression in Typ-II-Zellen.....	95
5.4.4 Versuche mit nitriertem Polytyrosin	97
5.5 Fazit und Ausblick.....	98
6 Zusammenfassung.....	99
7 Summary	101
8 Literaturverzeichnis	103
9 Anhang	115
9.1 Abkürzungs- und Formelverzeichnis	115
9.2 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	118
9.2.1 Abbildungsverzeichnis	118
9.2.2 Tabellenverzeichnis	121
9.3 Erklärung.....	122
9.4 Verzeichnis der akademischen Lehrer	123
9.5 Danksagung.....	124

1 Einleitung

1.1 Hintergrund

Die globale Zunahme allergischer Erkrankungen erregt weltweites Aufsehen. Die World Health Organisation (WHO) bezeichnete dieses Phänomen als eine der größten Herausforderungen des 21. Jahrhunderts. Vor allem in den Industrienationen ist die Inzidenz allergischer Erkrankungen wie Asthma bronchiale, allergischer Rhinitis, atopischen Ekzemen und anderen in den letzten Dekaden beständig angestiegen (Eder W, 2006; ISAAC, 1998).

Allein 300 Millionen Menschen leiden weltweit an Asthma bronchiale (GINA, 2008). Innerhalb Europas können von 30 Millionen Asthmatikern rund 70 % Dank geeigneter Medikamente und Behandlung gut mit ihrer Erkrankung leben. Jedoch leiden 1,5 Millionen Europäer an schwerem Asthma mit mindestens einem lebensbedrohlichen Anfall pro Woche. Laut einer dpa-Meldung anlässlich des Weltasthmatages 2005 stirbt in Westeuropa ein Patient pro Stunde an Asthma.

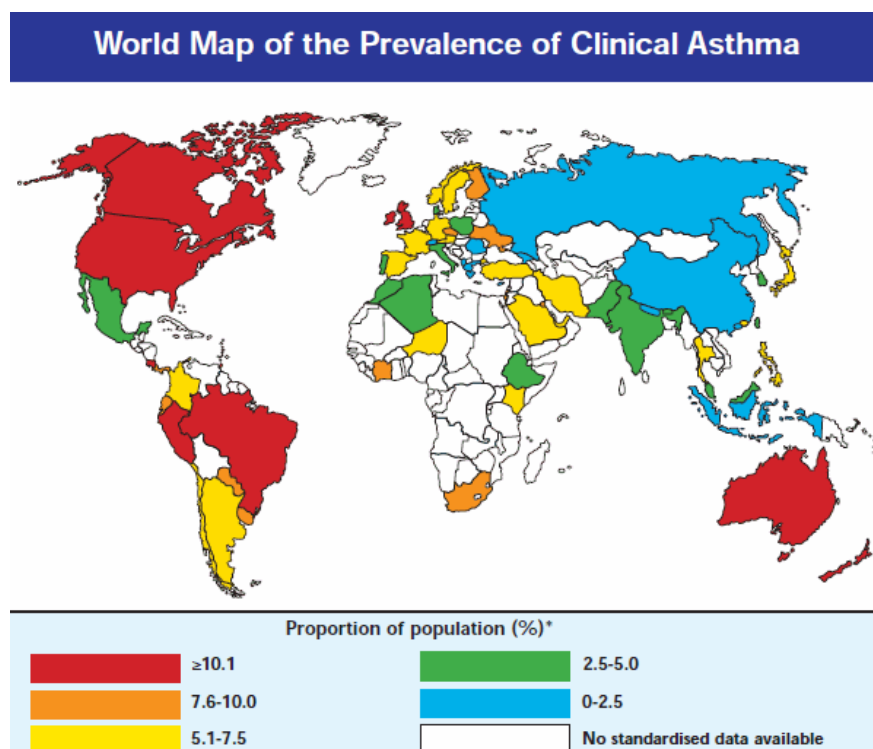


Abbildung 1: Übersicht der weltweiten Asthmaprävalenz (Quelle: Matthew M, 2004, GINA)

1.1.1 Charakterisierung der Erkrankung Asthma bronchiale

1.1.1.1 Klinisches Erscheinungsbild

In der Praxis handelt es sich beim Asthma vor allem um eine klinische Diagnose, welche auf charakteristische Beschwerden und Symptome und dem Nachweis einer (partiell-) reversiblen Atemwegsobstruktion und/oder einer bronchialen Hyperreagibilität beruht. Die Symptome reichen von geringgradigem Beklemmungsgefühl („Brustenge“) oder Husten bis zur schwergradigen Atemnot und können intermittierend (z. B. arbeitsplatzbezogen, abhängig vom saisonalen Pollenflug) oder persistierend vorhanden sein. In der Jugend sind Allergien der stärkste prädisponierende Faktor bei der Entwicklung des Asthmas. Auch im Erwachsenenalter sind Allergien häufig und in bis zu 80 % der Fälle als primär Asthma-verursachende Faktoren zu eruieren.

Ein intermittierendes Asthma wird häufig durch Infektionen der Atemwege getriggert. Bei Erwachsenen spielen berufsbedingte Substanz-Belastungen (Lösungsmittel, Latex, Mehl u.a.) als Auslöser eine übergeordnete Rolle. Allergien bzw. IgE-Antikörper gegen Umweltallergene sind hier nicht nachweisbar.

Mischformen sind sehr häufig, insbesondere kann bei einem initial allergischem Asthma im Verlauf die intrinsische Komponente klinisch in den Vordergrund treten (NVL Asthma, 2011).

1.1.1.2 Physiologie

Pathophysiologisch betrachtet liegt bei Asthmatikern eine chronisch-entzündliche Reaktion des Immunsystems der Atemwege vor, welche durch eine persistierend erhöhte Anzahl folgender Zelltypen gekennzeichnet ist:

- Eosinophilen Granulozyten
- Aktivierte Mastzellen
- Makrophagen und
- T-Helferzellen-2 (T_H2-Lymphozyten)

Es besteht eine Sensibilisierung und bronchiale Hyperreagibilität, welche bei Kontakt mit Allergenen bzw. deren Bindung an das spezifische IgE auf Mastzellen und Granulozyten, zu explosionsartiger Degranulation mit Freisetzung von Histamin und anderen Entzündungsmediatoren führt. Bei dieser allergischen Sofortreaktion (Typ I)

wird zwischen einer Früh- und Spätreaktion unterschieden. Die asthmatische Frühreaktion ist pathogenetisch durch die IgE vermittelte Entzündungszellaktivierung und die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren bedingt. Sie imponiert klinisch als akute Bronchialobstruktion, bedingt durch ein rapides Anschwellen der Schleimhaut mit massiver Schleimabsonderung und die Kontraktion der glatten Muskulatur der Luftwege - akute Atemnot des Patienten ist die Folge. Die Spätreaktion (2 bis 24 h nach der Frühreaktion) wird durch die Aktivierung von migrierten eosinophilen Granulozyten und die Freisetzung einer erneuten Welle proinflammatorischer und bronchokonstriktorischer Mediatoren verursacht.

Zu den Entzündungsmediatoren gehören Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren, Lipidmediatoren, Immunglobuline und Histamine. Zum Beispiel veranlasst das von T_H2-Lymphozyten gebildete Interleukin-4 (IL-4) den Immunglobulinswitch der B-Zelle zur IgE-Produktion. IL-5 unterstützt die Produktion und das Überleben eosinophiler Granulozyten. IL-13 fördert die Schleimproduktion. All dies sind typische Kennzeichen einer asthmatischen Reaktion (siehe auch „Immunobiology of asthma“, Hamid et al., 2009).

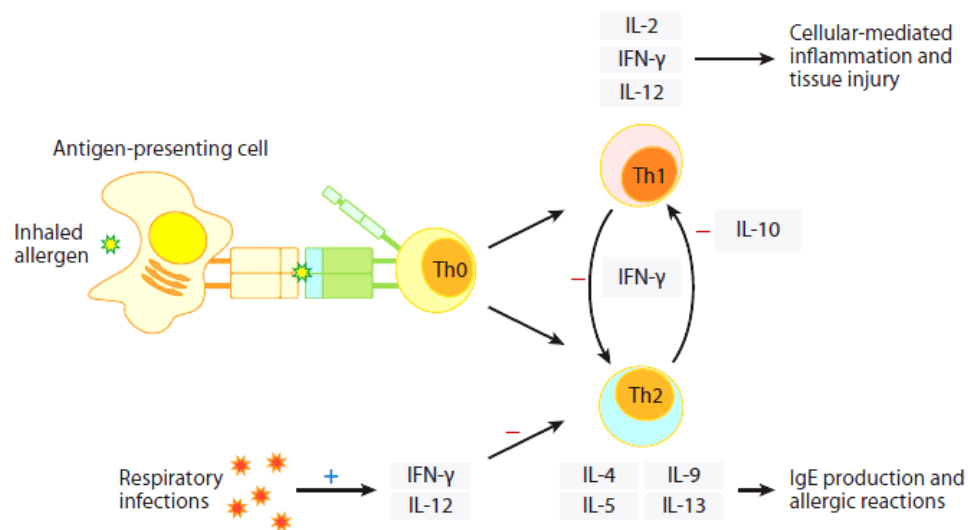


Abbildung 2: Regulation von T_H2-Zellen, Zytokinen und anderen Faktoren, welche die Immunreaktion beeinflussen. Abkürzung: IFN= Interferon, Ig= Immunglobulin, IL= Interleukin (Quelle: Hamid Q, 2009, Fig.3)

Die Lungen asthmakrankter Patienten weisen zudem unterschiedliche Grade struktureller Veränderungen des Lungengewebes auf, genannt Airway Remodeling. Hierbei kommt es zu einer Becherzellhyperplasie, einer Hypertrophie und Hyperplasie der Muskelzellen, subepithelialer Fibrose und gesteigerter Angiogenese.

Zu den wichtigsten Remodeling-assoziierten Zytokinen werden TGF-β, PDGF, IL 6, 11, 13, 17 und IL 25 gezählt (Boulet LP, 2007).

1.1.2 Risikofaktoren und Hypothesen zur Entstehung des Asthmas

Bei den vorgeburtlichen Faktoren, welche zur späteren Entwicklung eines Asthma bronchiale prädestinieren können, spielen erkrankte Elternteile eine große Rolle. Insbesondere eine erkrankte Mutter (Thornton CA, 2010), mütterlicher Nikotinkonsum, unausgewogene Ernährung-, Stress-, häufiger Gebrauch von Antibiotika seitens der Mutter oder auch eine Geburt per Kaiserschnitt gelten als Risiken.

In der Kindheit wurden Korrelationen zwischen der Entwicklung eines allergischen Asthmas und niedrigem sozioökonomischen Status beschrieben. Zudem werden Tierkontakt, keine oder eine zu kurze Stillzeit und das Geschlecht¹ als Risikofaktoren diskutiert. Des Weiteren korrelieren eine bereits frühkindlich eingeschränkte Lungenfunktion, das häufige Inhalieren von Abgasen und Zigarettenrauch und die Verabreichung von Antibiotika (Johnson CC, 2005) mit dem Auftreten der Erkrankung. Entwickeln Erwachsene ein allergisches Asthma, liegt dies zumeist an einer Reaktivierung des Kindheitsasthmas durch genannte Triggerfaktoren (s. 1.1.1.1).

Erstaunlich ist die weltweit große Diskrepanz in der Prävalenz des allergischen Asthmas. Studien mit Kindern und Erwachsenen ergaben niedrige Raten (1 % - 4 %) in asiatischen Ländern (insbesondere in China und Indien) und hohe Raten (15 % - 20 %) in England, Schottland, Kanada. Als wahrscheinliche Erklärung gelten die Interaktionen zwischen genetischen Grundmustern² einer Gesellschaft und spezifischen Einflussfaktoren aus ihrer Umwelt, Gene-Environmental-Interactions genannt (Subbarao P, 2009).

Der drastische Anstieg allergischer Erkrankungen in entwickelten Ländern innerhalb der letzten Jahrzehnte lässt an einer Veränderung *genetischer* Faktoren vieler Völker über einen so kurzen Zeitraum zweifeln (Ho SM, 2011).

Beispielsweise zeigen Erhebungen aus den USA (Pleis et al., 2009) einen Anstieg der Lebenszeitprävalenz von Asthma bei Erwachsenen innerhalb von 5 Jahren (Messungszeitraum von 2003 bis 2008) von 10 % auf über 12 %.

In Australien zeigte die „North West Adelaide Health Study“ (2007) einen Prävalenzanstieg bei über 18-jährigen von 12,5 % (2000-2003) auf 16,2 % (2004-2006) an. Die deutschen GEDA-Daten 2009 bezüglich der Lebenszeitprävalenz des Asthmas liegen

¹ Im Kindesalter sind deutlich mehr Jungen als Mädchen betroffen, ab dem 12. Lebensjahr Umkehrung der Ratio, im Erwachsenenalter haben deutlich mehr Frauen als Männer Asthma (Kabesch, 2010)

² z.B. das Vorhandensein spezifischer HLA Allele; Polymorphismus des FcεRI-β, des Zytokins Interleukin 4, des CD14 oder anderer Genorte (Sharma S, 2011) .

mit über 9 % höher als die von Gesundheitssurveys 2003 und 2006 ermittelten Prävalenzen von 5,7 % bzw. 7 % (RKI 2004; RKI 2006).

Aus diesem Grund wird nach Belastungen und Auslösern des allergischen Asthmas gesucht, deren Auswirkungen in engerem zeitlichen Zusammenhang stehen und insbesondere bei genetisch vorbelasteten Individuen zu einem Ausbruch der Erkrankung führen können (Gene-Environmental-Interactions).

Ein vielbearbeiteter Ansatz umfasst die Beiträge zur so genannten *Hygienehypothese*. Sie beschäftigt sich mit der verhinderten Ausbildung eines kompetenten und adäquat reagierenden Immunsystems. Übertriebene hygienische und präventive Maßnahmen haben einen zu geringen Kontakt mit Krankheitserregern und Umweltallergenen zu Folge. Dies begünstigt die Sensibilisierung und die Ausbildung einer Atopie³ und/oder von manifesten Allergien. Allergenkontakt führt hierbei in der Folge zu unkontrollierten und überschießenden Reaktionen der körpereigenen Abwehrmechanismen. Eine typische Ausprägung einer solchen Reaktion ist das exogen-allergische Asthma. Als Begründung wird ein Persistieren der kindlichen zellulären T_H2 -gesteuerten Immunantwort diskutiert, wodurch die Ausbildung der adulten T_H1 -gesteuerten Immunantwort unterbleibt (Shi YH, 2011; Cohn L, 2004; Robinson D, 1992).

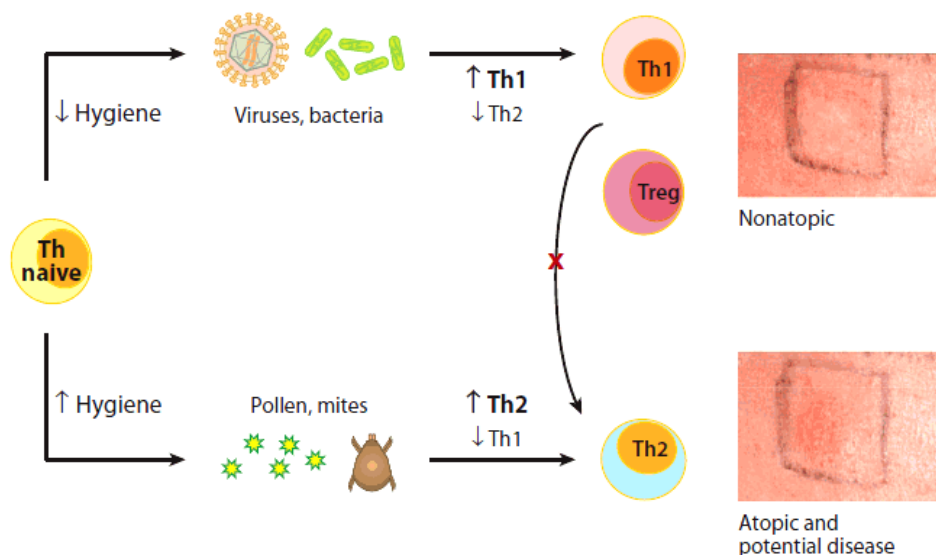


Abbildung 3: Verbildlichung der Hygiene-Hypothese und des möglichen Einflusses früher Infektionen auf die Entwicklung der Immunantwort. Abkürzung: Treg= regulatorische T-Zelle (Quelle: Hamid Q, 2004, Fig.5)

³ Atopie bezeichnet die körperliche Bereitschaft zu einer erhöhten Bildung von Immunglobulin-E-Antikörpern (IgE), bzw. die Neigung mit allergischen Reaktionen vom Soforttyp (Typ-I-Allergie) auf den Kontakt mit ansonsten harmlosen Substanzen aus der Umwelt zu reagieren.

Einen weiteren Erklärungsansatz für die steigende Prävalenz des Asthmas basiert auf der Schadstoffverschmutzung der Umwelt und wird unter der Bezeichnung *Umwelthypothese* verfolgt. Der negative Einfluss Abgas-assoziierter Luftverschmutzung auf die pulmonale Gesundheit erhält große Aufmerksamkeit und wird anhand vieler Studien an Mensch und Tier belegt (Saxon A, 2005).

1.1.2.1 Epidemiologische Forschung zum Thema Umwelthypothese

Fakt ist: Die Anzahl Asthma-Erkrankter in smogbelasteten Ballungsräumen ist besonders hoch (Bråbäck L, 2009; Koenig, 1999). In einem Review der WHO von 2005 wird betont, dass die durch Luftverschmutzung hervorgerufenen entzündlichen Prozesse vor allem das Risiko einer Neuerkrankung an *nicht*-allergischen Atemwegserkrankungen und pathologischen Symptomen zu erhöhen scheinen. Es sei unklar, ob Verkehrsabgase eine allergische Sensibilisierung verursachen können, da die Ergebnisse verschiedener Studien widersprüchlich seien (Krzyzanowski M, 2005).

Seither wurden Kohortenstudien größeren Umfangs in verschiedenen Ländern gestartet, um genauer zu überprüfen, ob die Abgasbelastung zu einer Sensibilisierung und konsekutiv zur Entwicklung allergischer und/oder asthmatischer Symptome führt (Nordling E, 2008; Brauer M, 2007).

Häufig beobachtete man Probanden im kleinkindes- bis jugendlichen Alter, da sich allergisch-asthmatische Symptome zumeist früh manifestieren.

Morgenstern et al. veröffentlichten im Jahr 2008 eine Studie, welche die Ausbildung allergischer Erkrankungen bei 2860 Kindern im Alter von vier Jahren und 3061 Kindern im Alter von sechs Jahren im Großraum München beobachtete. Die Probanden waren Feinstaub ($PM_{2,5}$)⁴ und Stickstoffdioxid (NO_2) ausgesetzt, die dazugehörigen Belastungsgrade wurden technisch ermittelt. Bei der Auswertung konnte eine deutliche Korrelation zwischen einer hauptstraßennahen Wohnsituation und asthmatischer Bronchitis, Heuschnupfen, Ekzemen und Sensibilisierung festgestellt werden.

In vorhergegangenen Studien selbiger Autoren waren typische Störgrößen erkannt worden, welche bei diesen Untersuchungen berücksichtigt wurden und so die Ergebnisqualität verbesserten: Geschlecht, elterliche Atopie oder Allergie, elterlicher

⁴ Die als Feinstaub ($PM_{2,5}$) bezeichnete Staubfraktion enthält zu 50 % Teilchen mit einem Durchmesser von 2,5 μm , zudem einen höheren Anteil kleinerer Teilchen und einen niedrigeren Anteil größerer Teilchen. $PM_{2,5}$ ist eine Teilmenge von PM_{10} (10 μm Durchmesser). Partikel dieser Größe können bis in die Alveolen gelangen (Umweltbundesamt, 2011).

Bildungsgrad, Geschwister, Luftbelastung durch Zigarettenrauch, Gasherde oder Pilzsporen in Wohnräumen, hohe Luftfeuchtigkeit im Haus und Haustiere.

Bråbäck et al. haben die oben beschriebene und weitere Studien anderer Länder im Jahr 2009 ausgewertet und bestätigt, dass Abgasexpositionen die Entwicklung von Atemwegserkrankungen im Kindesalter begünstigen. Bei deutschen, niederländischen und schwedischen Vorschulkindern wurde insgesamt ein erhöhtes Sensibilisierungs-Risiko festgestellt, während dies für norwegische Kindern bei ähnlicher Abgasbelastung nicht galt. Die Autoren bemängelten jedoch, dass der Einfluss der Schadstoffe auf eine allergische Sensibilisierung bei vielen dieser epidemiologischen Studien schwer von anderen individuellen Faktoren⁵ abzugrenzen sei. Die unterschiedlichen Messparameter und Voraussetzungen, wie verschiedene Luftbelastungsgrade und Erfassungsmethoden, können zudem für die inkonsistenten Ergebnisse der 13 ausgewerteten Paper verantwortlich sein und erschweren den Vergleich.

Demgegenüber belegen viele Kohortenstudien europäischer und nicht europäischer Länder, dass Verkehrsabgasbelastungen eine *bereits bestehende* asthmatische Erkrankung verschärfen und zu Exazerbationen führen können.

Die akute Wirkung der Abgasbelastung auf die Lungenfunktion erwachsener Asthmatiker wurde in 2 Studien von McCreanor (2007) in London und von Zhang et al. (2009) in New Jersey beschrieben. In beiden Fällen handelte es sich um Echtzeitstudien mit 60 Probanden. Verglichen wurde das Laufen in 2 unterschiedlich schadstoffbelasteten Zonen (stark befahrene Straße vs. Park) für die Dauer von jeweils 2 Stunden. Direkt im Anschluss der Versuche untersuchte man verschiedene Lungenfunktionsparameter. Beide Studien zeigten signifikant eingeschränkte Lungenfunktionswerte nach der Aussetzung hoher Abgasdosen für 2 Stunden. Die Diskrepanz zwischen beiden Messungen fiel bei schwerer erkrankten Probanden gravierender aus.

In einer älteren Studie (Strand et al., 1998) setzte man 16 Asthmatiker im Alter von 20-52 Jahren jeweils 30 min - an vier Terminen in vierwöchigen Abständen - 260 ppb Stickstoffdioxid aus (Versuchskammer), anschließend ließ man sie Birkenpollenallergen inhalieren. Nach weiteren fünf Tagen wurde eine Provokation durchgeführt. Dieser Test ergab, dass die Patienten nach der wiederholten Aussetzung der

⁵ z.B. genetische Veranlagungen/familiärer Hintergrund, unterschiedliche Altersstufen, u. a. nicht kalkulierte Störfaktoren

Stickstoffdioxid-Luftbelastungen auf geringe, nicht allergene Dosen des Birkenpollenallergens asthmatisch reagierten.

Wesentlich zahlreicher und umfangreicher sind die Kohortenstudien, die mit Probanden im Kindesalter durchgeführt wurden. Als Beispiel sei die Studie von Meng et al. (2010) genannt. Bei 1502 jungen Asthmapatienten, wohnhaft in der Smog belasteten Stadt San Joaquin Valley in Kalifornien, wurde die hohe Symptommfrequenz und die Häufung Asthma-assoziiierter Krankenhausaufenthalte insbesondere auf die hohen Ozonwerten und die Feinstaubbelastung zurückgeführt. Escamilla-Nunez et al. (2008) eruierten den Einfluss verkehrsbedingter Luftverschmutzung auf die Symptome asthmakrankter Kinder in Mexico City. Die Metropole gehört zu den größten und am stärksten belasteten Städten der Welt. 85 % der Luftverunreinigung wird den Motorfahrzeugen zugeschrieben. Hier wurde eine prospektive Studie über 22 Tage an 150 erkrankten und 50 gesunden Kindern im Alter von 6 bis 12 Jahren vorgenommen. Dabei konnte eine signifikante Korrelation zwischen schweren respiratorischen Symptomen/dem häufigen Medikationseinsatz erkrankter Kinder und den Abgas-komponenten Stickstoffdioxid (NO₂) und Ozon festgestellt werden. Bei gesunden Kindern wurde eine signifikante Assoziation von NO₂ und vermehrtem Husten ermittelt. In beiden Fällen verschärften die über viele Tage kumulierten Dosen der Gase die Symptome.

1.1.2.2 Tierexperimentelle Studien zum Thema Umwelthypothese

Da die Immunreaktion von Nagern der menschlichen ähnelt existieren viele Versuche, die insbesondere Ratten oder Mäuse einzelnen Gasen oder Gasgemischen aussetzten, wie dem Ozon (Hunter DD, 2010; Kierstein S, 2008), Stickstoffdioxid (Müller B, 1998; Hayashi Y, 1987), Zigarrettenrauch (Misaka S, 2011; Melgert BN, 2004), oder Dieselabgasen (Yanagisawa R, 2006).

Verschiedenen Quellen belegen die Aggravation der typischen Anzeichen der allergischen Typ-I-Reaktion im Mausmodell nach Aussetzung von Stickstoffdioxid (Bevelander M, 2007; Poynter ME, 2006). Die Erzeugung dieser Reaktion im Tiermodell ermöglicht den Vergleich der genetisch identischen Tiere eines Stammes mit der Kontrollgruppe sowie mit gezielt genetisch veränderten Tieren (z.B. Knock Out-Mäuse), sei es, um entzündungsfördernde oder hemmende Transmitter zu identifizieren und die Regulation antioxidativer Enzyme zu beurteilen (Olker C, 2004), um bestimmte Zellpopulationen zu beobachten (Hodgkins SR, 2010) oder die

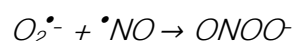
Lungenfunktion und die parenchymalen Veränderungen (Wegmann M, 2005; Fehrenbach A, 2005) im Folgenden genau untersuchen zu können.

In den oben genannten und vielen anderen Studien wird die schädigende Wirkung der Abgase auf den Respirationstrakt oxidativem und nitrosativem Stress zugeschrieben, da die Abgaskomponenten Ozon und Stickstoffdioxid in der Lage sind ROS (Reactive Oxygen Species) bzw. RNS (Reactive Nitrogen Species) zu bilden. Die gezielte Aussetzung gegenüber einzelnen Gasen oder Gaskombinationen erleichtert die Identifizierung der gasspezifischen oder durch Kombination ausgelösten Gesundheitsschäden im Tiermodell.

1.1.3 Oxidativer und nitrosativer Stress

Generell werden reaktive Sauerstoffspezies und reaktive Nitrospezies bei verschiedenen enzymatischen Reaktionen und chemischen Prozessen synthetisiert (z.B. Peroxidasen aus Granulozyten) oder können direkt eingeatmet werden. Auch von Endothelzellen freigesetztes Stickstoffmonoxid (NO) kann in der Lunge mit ROS interagieren und andere RNS bilden. Die ROS, NO und RNS sind für viele physiologische Reaktionen essentiell, so wirkt NO bronchodilatorisch (Ricciardolo FL, 2006) und gebildete reaktive Spezies (ROS, RNS) sind für die Eliminierung eingedrungener Mikroorganismen wichtig.

Durch diffusionskontrollierte Reaktion zwischen NO- und Superoxid-Radikalen kann Peroxinitrit entstehen, welches weitaus reaktionsfreudiger ist als seine Vorgänger:



Peroxinitrit und Hydroxidradikale werden u.a. von Makrophagen als hochpotente Zellgifte zur Abwehr von Keimen durch Apoptose eingesetzt.

Normalerweise wird eine Balance zwischen der ROS/RNS-Produktion und den Schutzmechanismen vor oxidativen/nitrosativen Schäden von nicht enzymatischen⁶ und enzymatischen⁷ Mechanismen innerhalb der Zelle aufrecht erhalten. Wenn die Atemwege jedoch starkem Stress durch beispielsweise Schadstoffe/Reizgase aus der Luft, Infektionen, Entzündungsreaktionen ausgesetzt sind, wird dieses Gleichgewicht zu Gunsten der reaktiven Spezies verschoben. Antioxidantien gehen mit reaktiven Spezies Verbindungen ein und neutralisieren sie. Ist das antioxidative Potential

⁶ z.B. Vitamine, Thiole

⁷ z.B. Glutathionreduktase/Glutathionperoxidasen, Katalase, Superoxide Dismutase

aufgebraucht können durch die Überzahl reaktionsfreudiger Spezies gravierende Schäden an DNA, Lipiden, Proteinen und Kohlenhydraten entstehen. Die Zellfunktionen werden gestört, entzündliche Reaktionen resultieren.

In dieser Hinsicht spielen die ROS und RNS bei akuten Lungenerkrankungen wie dem ARDS (Acute Respiratory Distress Syndrom) sowie bei interstitiellen Erkrankungen wie der COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease), zystischer Fibrose und Asthma eine große Rolle (Anderson JT, 2011; Folkerts G, 2001).

Viele Quellen belegen, dass die Lungen von Asthma-Patienten bereits endogen einem konstant hohen Level an oxidativem und nitrosativem Stress ausgesetzt sind, vgl. Ghosh et al. „Nitric oxide metabolism in asthma pathophysiology“ (Review, 2011). Das Gleichgewicht ist bereits verschoben und weitere Belastung kann rasch zu einer Entgleisung führen. NO als relativ stabiles Radikal wird bereits als klinischer Parameter bei Asthmatikern bestimmt, da seine Konzentration in der Ausatemluft Erkrankter bis zu 3-mal höher liegt als bei Gesunden (Ricciardolo et al., 2004).

1.1.3.1 Proteinnitrierung

Der Vorgang der Protein-Nitrierung erregte in den letzten Jahren viel Aufmerksamkeit. Hierbei kommt es durch einen Überschuss an hochreaktivem Peroxynitrit zu einer Nitrierung der proteinogenen Aminosäure Tyrosin.

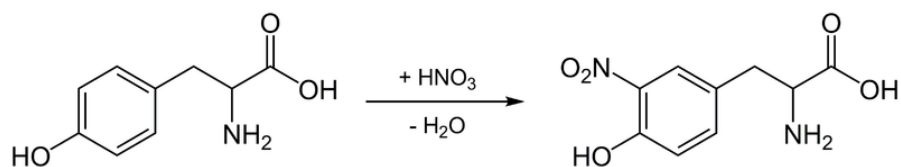


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Nitrierungsvorgangs der Aminosäure Tyrosin anhand der Strukturformeln (Quelle: Yikrazuul, 2007).

Dieser Vorgang findet physiologisch in begrenztem Ausmaß beispielsweise während Entzündungsphasen und des Alterungsprozesses statt und führt möglicherweise zu einer Optimierung der körpereigenen Abwehrreaktion (Greenacre SA, 2001). In höherer Konzentration wird die Formation dieser Nitrotyrosinreste, neben Lungenerkrankungen wie Asthma und COPD, mit zahlreichen weiteren Organerkrankungen in Verbindung gebracht. Die Störungen der Proteinfunktionen sollen insbesondere auch zu neurologische Erkrankungen führen, wie z.B. der Amyotrophen Lateralsklerose, Alzheimer, Parkinson, Apoplex u.a. (Mangialasche F, 2009; Kaminsky, 1999).

Wie von MacPherson et al. (2001) und De Andrade et al. (2000) beschrieben, ist bei Asthmatikern im Vergleich zu Gesunden eine hohe Verunreinigung der Lunge durch Nitrotyrosin-Formationen zu finden. Es gibt verschiedenen Methoden die Konzentration des Nitrotyrosins in der Ausatemluft oder in der epithelialen Schleimschicht der Lunge zu messen, z.B. die Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (Tsikas, 2005). Eine konkrete Aussage, ob die Konzentration direkt mit der Schwere der Erkrankung korreliert, konnte jedoch noch nicht getroffen werden (Beispiele: *Pro*: Fitzpatrick et al., 2009, *Kontra*: Celio et al., 2006).

1.1.3.1.1 Proteinnitrierung - Ursache für refraktäre Asthmaerkrankungen?

Sugiura et al. veröffentlichten 2011 den Artikel „Frontiers in nitric oxide and redox signaling nitrative stress in inflammatory lung diseases“. Hier wurde die Wirkung hoch dosierter Steroide auf Patienten mit refraktärem Asthma getestet. Insbesondere beobachtete man die Regulierung der neuronalen- (NOS 1), epithelialen- (NOS 3) und induzierbaren NO-Synthase (iNOS oder NOS 2 abgekürzt), wobei eine Erhöhung der iNOS bei vielen Lungenerkrankungen bekannt ist. Zudem wird das iNOS-Gen durch verschiedene proinflammatorische Zytokine stimuliert. Es soll neben Epithelzellen auch von Makrophagen, Mastzellen, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten exprimiert werden⁸. Tatsächlich konnten die Steroide keine Suppression der iNOS Synthese oder der durch RNS gebildeten Nitrotyrosin-Formationen bewirken.

Eine weitere enzymale Aberration betrifft die Aktivität der Histon Deacetylase 2 (HDAC 2). HDAC 2 ist nachweislich bei Asthma- und COPD-Patienten erniedrigt, bedingt durch die Nitrierung ihrer Tyrosinreste durch radikale nitrosative Spezies. Dies führt zu einer exzessiven Produktion proinflammatorischer Zytokine. Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass die Proteinnitrierung zu refraktären Erkrankungsformen führen kann.

1.1.3.1.2 Proteinnitrierung außerhalb des Körpers

Franze et al. belegten im Jahr 2005, dass die Nitrierung von Proteinen und potentiellen Allergenen bei hoher Luftbelastung durch Stickstoffdioxide und Ozon bereits außerhalb des Körpers stattfinden kann. Hierfür wurden 16 Proben aus dem Großraum München untersucht⁹. Zudem wurden Proteinproben (Bovines Serum Albumin (BSA)

⁸ Nur eine begrenzte Anzahl an Studien konnten die Expression des Enzyms, vor allem von eosinophile Granulozyten (siehe auch Yamamoto et al., 2011), in den Atemwegen Asthmaerkrankter nachweisen (Nakaji H, 2011).

⁹ Verkehrsstraßenstaub, Fensterbeläge, Feinstaubproben aus der Luft

und Birkenpollen Extrakt (BPE)) teilweise einem Gasgemisch aus Stickstoffdioxid und Ozon und teilweise nur NO₂ ausgesetzt. Es wurde eine besonders effektive Nitrierung durch das Gasgemisch festgestellt. Verdoppelte man die Gaskonzentration (z.B. von 50 auf 100 ppm) wurde eine mehr als 10-fache Erhöhung der EDN (Equivalent Degrees of Nitration) des BSA gemessen. Dies lässt vermuten, dass eine relativ geringgradige Veränderung des Belastungsgrades ein wesentlich höheres Ausmaß der Proteinnitrierung nach sich zieht.

Diese veränderten Proteine werden von Individuen eingeatmet und können tief in die Atemwege gelangen. Aus dieser Tatsache resultiert folgende Frage:

Welche Wirkung haben insbesondere diese inhalierten nitrierten Proteine auf die Genese von akut-entzündlichen Atemwegserkrankungen?

1.2 Eigene Vorgehensweise

Diese Arbeit wendet sich Aspekten der Umwelthypothese zu, der durch Luftverschmutzung ermöglichten Nitrierung von Proteinen und ihren Konsequenzen.

Am Mausmodell testete man erstmalig in vivo die akuten Folgen der Inhalation der nitrierten und nicht kreuzreaktiven Allergene Ovalbumin¹⁰ (OVA) und Keyhole Limpet Hemocyanin¹¹ (KLH). OVA und KLH gelten als Standard-Substanzen zur Erzeugung akuter und chronischer asthmatischer Erkrankungen in Tiermodellen (Beispiele: Caucig P, 2010; Hurst SD 2001; Guo J 2001; Patterson R 1975).

1.2.1 Arbeitshypothesen

Drei Hypothesen wurden für diese Studie aufgestellt und die Methoden ihrer Prüfung festgelegt.

1. Die Nitrierung der Allergene verstärkt ihr allergenes Potential und somit die akut entzündliche Reaktion der Atemwege.

Hierfür verglich man die Immunreaktionen der Tiere nach der Behandlung mit den nicht-nitrierten und nitrierten Substanzen.

¹⁰OVA: 55 bis 65%iger Proteinanteil des Eiklars

¹¹KLH: Hochmolekularer Proteinkomplex aus der Hämolymphe der Kalifornischen Schlüsselnapfschnecke unspezifischer Immunstimulator bei Wirbeltieren

2. Bei bestehender Sensibilisierung gegen ein bestimmtes nitriertes Allergen, reagiert das Individuum auch gegen ein anderes nitriertes Allergen, sodass es zu Kreuzreaktionen kommt.

Hierfür wurden die Substanzen nOVA und nKLH in den Versuchsschemata kombiniert (siehe Abs. 2.2). In größerem Umfang wurden alle Versuche mit C57BL6-Tieren durchgeführt. Pränante Versuchskombinationen wurden mit Tieren des BALB/c-Stammes wiederholt und mit den Resultaten der C57BL6-Tiere vergleichend diskutiert. Der Vergleich bietet sich im Hinblick auf die geführten Diskussionen um die unterschiedlichen Eigenschaften der Mäuse-Stämme in Asthmamodellen an (Gueders MM, 2009; Van Hove CL, 2009).

Mit BALB/c-Tieren startete man zudem exemplarische Versuche, die zur Klärung folgender Hypothese dienten:

3. Die Behandlung von BALB/c-Tieren mit der nitrierten Aminosäure Polytyrosin führt zu einer akuten entzündlich-allergischen Atemwegsreaktion.

Folgende Parameter wurden in diesen Versuchen beobachtet: Lungenfunktion (Atemwegshyperreagibilität), die Histologie (parenchymale Veränderungen), die bronchoalveoläre Lavage (Proteingehalt und Zytologie). Zudem wurden Typ-II-Pneumozyten aus den Lungen gewonnen. Die Typ-II-Zellen bilden ca. 5 % der pulmonalen Zellpopulation, können sich bei Bedarf zu Typ-I-Pneumozyten differenzieren und sind zudem die metabolisch aktivsten Zellen des Respirationstraktes (Evans, 1975). Aus ihnen isolierte man Proteine und RNA. Anschließend konnte der Proteingehalt gemessen werden. Um Einblick in den antioxidativen Status der Typ-II-Zellen zu gewinnen wurden zudem Western Blots zur Enzymdetektion durchgeführt, diese Ergebnisse wurden durch immunhistochemische Färbungen von Gewebeschnitten ergänzt. Bei den hierfür ausgewählten antioxidativen Enzymen des Glutathion (GSH)-Systems handelte es sich um die Glutathionreduktase (GR), die Glutathionperoxidase 3 (GPX3) und ggf. die Glutathionperoxidase 4 (GPX4). Die Genexpression dieser Enzyme bestimmte man anschließend mittels Real time-quantitative-PCR (RT-qPCR).

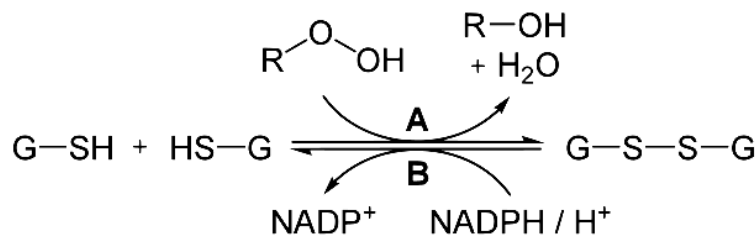


Abbildung 5: Die von der Glutathionperoxidase (A) bzw. Glutathionreduktase (B) katalysierten Reaktionen, schematische Darstellung. Abkürzungen: R = Rest, G-SH = Glutathion, G-S-S-G = Glutathiondisulfid (Quelle: Yikrazuul, 2009)

Die essentielle Bedeutung des GSH-Systems bei Belastung durch reaktive Spezies wurde bereits vielfach beschrieben. Einflussfaktoren auf den GSH-Status des Respirationstraktes (inflammatorische Zytokine, reaktive Spezies, Alkylantien, Medikamente, u.a.) sind in einem Review von Rahmen, I. (2005) zusammengefasst worden.

Koike et al. (2007) stellten fest, dass ein erniedrigter intrazellulärer GSH-Gehalt die T_H1-Zell-Aktivität erniedrigt und die T_H2-Zell-Aktivität erhöht. In der Lunge wurden sehr hohe GSH-Konzentrationen in der epithelialen Schleimschicht bzw. dem Epithelial lining Fluid (ELF) gefunden, welche die erste Barriere gegen Radikale darstellt. Alveolarmakrophagen, Endothelzellen (arteriell und venös) und insbesondere alveolare Epithelzellen stellen die reduzierte Form des Glutathions bereit. Eine Steigerung der epithelialen Permeabilität durch zu geringe Abwehr ermöglicht die Passage inflammatorischer Mediatoren und pathogener Substanzen der Blutbahn, dem Interstinum sowie den Alveolen. Hieraus resultieren verstärkte Entzündungsreaktionen und Gewebeschäden.

1.2.2 Zielsetzung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit den Auswirkungen der Inhalation nitrierter Proteine in vivo. Die vielfältigen Versuchskombinationen ermöglichen einen Einblick in die pulmonalen Reaktionen insbesondere von C57BL6-, sowie von BALB/c-Mäusen im akuten Asthmaschema. Die Prüfung der Hypothesen an diesem Modell soll eine Basis für aufbauende Forschungsprojekte bilden und ist ein Schritt auf dem Weg zur Ergründung der vielfältigen Auslöser pulmonaler Inflammation.

2 Materialien

2.1 Geräte

Acryl-Expositionsklammer (Provokation)	Eigenanfertigung (20x 20x 15 cm)
Antikörperplatten	Beckton Dickinson Labware, NY, USA
Aquatex®, wasserlösliches Eindeckmedium	Merck AG, Darmstadt
Bench	Heraeus Lamin Air, Osterrode
Brutschrank	Cytoperm 2, Heraeus Instruments, Osterrode
Deckgläser	Menzel, Braunschweig
Düsengenerator	Pari, Starnberg
Einbettförmchen	Shandon, Astmor, England
Filterpapier (Porengröße: 150 µl, 20 µl)	Munktell & Filtrak GmbH, Bärenstein
Fotomikroskop	Leica, Wetzlar
Gefrierschrank	Heraeus Instruments, Osterrode
Gelelektrophorese Apparatur	Angewandte Gentechnologie Systeme GmbH, Heidelberg
Glaswaren	Schott, Mainz
Heizblock	Liebisch, Bielefeld
Infusionsbesteck (Infusomat-Leitung)	Braun, Melsungen
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr GmbH, Lienz; Hereaus freeze, Osterrode
Magnetrührer	IKA-Labortechnik, Staufen
Messkolben	Greiner Bio One, Frickenhausen
Mikroskop	Ernst Leitz GmbH, Wetzlar
Mikrotiterplatten	Greiner Bio One, Frickenhausen

Mikrotom	Leica, Wetzlar
Mikrowaage SBC 21	Scaltec Instruments GmbH, Göttingen
Mikrowelle	AEG, Nürnberg
Multipipetten	Eppendorf , Hamburg; Integra Biosciences, Fernwald
Nadelkanülen	Terumo, Leuven, Belgien
Nano-Drop-Spezialphotometer	PeQlab Biotech GmbH, Erlangen
Objektträger Superfrost	Menzel, Braunschweig
PCR- Thermocycler	Qiagen GmbH, Hilden
PCR- Tubes	LTS Labortechnik, Wasserburg
Photometer	Tecan Ultra384, Tecan, Crailsheim
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg; STARLAB GmbH, Ahrensburg; SARSTEDT AG & Co. Nümbrech
Powersupplies	Pharmacia Fine Chemicals, Wien, Österreich; GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Präparierbesteck	Aesculap AG, Tuttlingen
Präzisionswaage	Kern & Sohn GmbH, Balingen- Frommern
Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran "Immobilon-P", 0,45 µm Porengröße	Millipore GmbH, Schwalbach
Reaktionsgefäße	Becton Dickinson, USA; Eppendorf, Hamburg; Greiner, Frickenhausen
Real-Time-PCR-Thermocycler	Qiagen GmbH, Hilden
Schüttler	Bühler, Tübingen
Semi-Dry Transfer Unit w/	SERVA Electrophoresis GmbH,

Powersupply (TE 77XP)	Heidelberg
Spritzen (1 ml)	Becton Dickson, Heidelberg; Braun, Melsungen
Tisch-pH-Meter	Roth GmbH, Arlesheim
Trans-Blot- Apparatur (Graphit)	LKB Multiphor 2, Pharmacia
Vortexer	Heidolph, Schwabach
Wasserinkubatoren	Leica, Wetzlar; Köttermann GmbH & Co KG, Uetze/Hänigsen
Zählschablone "Neubauer improved bright line", Tiefe 0,100 mm/ 0,0025 mm ²	Fontaine, Waghäusel
Zentrifuge "Multifuge"	Shandon, southern Products Astmoor, GB
Zentrifuge "Varifuge" 3RS	Heraeus Sepatech, Osterrode
Zyto-Zentrifuge	Biofuge pico, Heraeus Instruments, Osterrode

2.2 Chemikalien

2.2.1 Einzelsubstanzen

Agarose, low melt, 1 %	Nu Sieve GTG Agarose, FMC , Rockland, Maine, USA
Aluminiumhydroxid Al (OH) ₃ (Inject Alum)	Pierce, Rockford, Illinois, USA
APS 10 % (Ammoniumperoxodisulfat)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Borsäure	Fischer Scientific GmbH, Schwerte
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Chloroform	Merck AG, Darmstadt
Coomassie-Blue	Serva AG, Heidelberg
Corbit Balsam	Hecht, Kiel- Hassee

DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium)	Sigma, Steinheim
EDTA	Sigma, Steinheim
Eisessig	Merck AG, Darmstadt
Eosin	Thermo, Pittsburgh, USA
Esmaron	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
FCS (Fetal Calf Serum)	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim
Giemsa-Lösung	Merck, Darmstadt
Glycerin	Pharmacia Biotech, Wien, Österreich
Glyzin	Merck, Darmstadt
Guanidinhydrochlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
H ₂ O ₂ (30 %)	Roth, Karlsruhe
Hämatoxylin	Thermo, Pittsburgh, USA
HCl (1 mol/l)	Merck, Darmstadt
Heparin-Natrium	Merial-GmbH, Hallbergmoos
HEPES Buffer Solution	PAA Laboratorien GmbH, Pasching, Au
Isopropylalkohol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ketamin (Ketaminhydrochlorid), 50 mg/ ml	Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg
Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH), ID-NR.: H7017-20 MG, 070M4890	Sigma-Aldrich, Steinheim
Liquemin	Merial-GmbH, Hallbergmoos
Low Cross Buffer	Candor, Bioscience GmbH, Wangen
Magermilchpulver	Flika Chemie GmbH, Buchs
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methacholin	Sigma-Aldrich, Steinheim

Methanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
NaCl-Lösung 0,9 %	Braun, Melsungen
NaOH-Lösung (1 mol/l)	Merck, Darmstadt
Narcoren 0,2 ml (Pentobarbital-Natrium)	Hofmann-La -Roche-AG, Mannheim
Nitrierung der Proteine	AG Dr. U. Pöschl, MPI für Biochemie, Mainz
Nuclease freies Wasser	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Ovalbumin (OVA)	Grad VI Sigma ,Chemie, Deisenhofen
PBS-Dulbecco 10x/1x (steril)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AU
Polytyrosin	AG Dr. U. Pöschl, MPI für Biochemie, Mainz
Protease-Inhibitor, Tabletten	Hofmann-La -Roche-AG, Mannheim
RNase freies H ₂ O	Qiagen GmbH, Hilden
Rocuronium (Esmeron®)	Essex Pharma GmbH, München
Rompun 2 %® (Xylazinhydrochlorid 20 mg/ ml)	Bayer Vital GmbH (Leverkusen)
Rotiphoress 30	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Serva, Heidelberg
SIGMAFAST™ BCIP®/NBT, Tabletten (Alkalische Phosphatase+ chromogenes Substrat, Anti-Rabbit IgG)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Stripping Buffer	Candor, Bioscience GmbH, Wangen
SYBR Green	Qiagen GmbH, Hilden
TBS (Tris-Buffered-Saline)-Lösung (10x)	Sigma-Aldrich, Steinheim
TEMED	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
The Blocking Solution	Candor, Bioscience GmbH, Wangen
Tris-Base	Acros Organics, Geel, Belgien
Tris-HCL	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Trizol	Invitrogen, Karlsruhe
Trypan blau 0,4 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Tween®20 (Polyoxyethylenesorbitan monolaurate)	Merck, Hohenbrunn
Washing Buffer (10x konzentriert)	Candor, Bioscience GmbH, Wangen
Wasserstoffperoxid (30 %)	Merck, Darmstadt
Xylol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

2.2.2 KITS

BCA™ Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Rockford, USA
Histostain®- SP Kits	Invitrogen GmbH, Darmstadt
QuantiTect® Rev. Transcription Kit	Qiagen GmbH, Hilden

2.2.3 Enzyme

Dispase® I(neutral protease, grande I) Cat. No. 04 942 086 001	Hofmann-La -Roche-AG, Mannheim
DNase I, Grande II, Mat. -No.: 10104159001	Hofmann-La -Roche-AG, Mannheim

2.2.4 Gelmarker

Novex® Multicolored Standard	Invitrogen GmbH, Darmstadt
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot

2.2.5 Antikörper

AK-Detektion/ Immunhistologie:

ACTB polyclonal antibody (β -Aktin), 1 μ g/ μ l, Size: 100 μ g, Cat. No.: PAB 13194	Abnova GmbH, Heidelberg
Anti- Rabbit IgG (whole Moleküle), Alkaline Phosphatase antibody produced in Goat, buffered aqueous solution, Conc.: 1,3 mg/ ml	Sigma Aldrich, St. Louis, US
Gpx3 (Gluthation-Peroxidase 3) Rabbit, anti human/mouse/rat polyclonal antibody, Conc.: 1 μ g/ μ l, Size: 150 μ l, Cat.No.: LS- C94174	LifeSpan Biosciences, Seattle, US
Gpx4 (Gluthation-Peroxidase 4) Rabbit anti Human/mouse/ rat polyclonal antibody, Conc.: 0,2 mg/ ml, Cat.No.: LS-B1596	LifeSpan Biosciences, Seattle, US
GR (Gluthation Reduktase) Rabbit, anti mouse/ rat, polyclonal antibody, Conc.: 1 mg/ ml	Abcam-plc, Cambridge, UK

AK-Platten:

84 μ l anti-mouse CD 45 -Leukocyte Common Antigen (LCA), (0,5 mg/ ml)	Biosciences, Pharmingen, Heidelberg
32 μ l anti-mouse CD 16/CD32 (0,5 mg/ ml)	Biosciences, Pharmingen, Heidelberg

2.2.6 Oligonukleotide für die RT-qPCR

Primerliste:

Name	Sequenz (5'-3')	Hersteller	ID
GR mus fw	TCGGAATTCATG CACGATCAC (21)	Eurofins MWG Operon, Ebersberg	Auftragsnr.: 2375871, Labor Nr.: 5414
GR mus rev	TGTTCAAGCGG CTCACATAG (20)	Eurofins MWG Operon, Ebersberg	Auftragsnr.: 2375871, Labor Nr.: 5414
Gpx4 mus fw	TCTCAGCCAAG GACATCGAC (20)	Eurofins MWG Operon, Ebersberg	Auftragsnr.: 2375871, Labor Nr.: 5414
Gpx4 mus rev	CCAGGATTCGTA AACCACACTC (22)	Eurofins MWG Operon, Ebersberg	Auftragsnr.: 2375871, Labor Nr.: 5414
Gpx3 mus fw	AGGAAGCCACA TTCCCAGTC (20)	Eurofins MWG Operon, Ebersberg	Auftragsnr.: 2375871, Labor Nr.: 5414
Gpx3 mus rev	TGCCAAGCCGT AAACACAG (19)	Eurofins MWG Operon, Ebersberg	Auftragsnr.: 2375871, Labor Nr.: 5414
HKG L32: Mm_Rpl32_2_S QuantiTect, Primer Assay	Keine Hersteller- Angaben	Qiagen GmbH, Hilden	Catalog No.: QT01752387

2.3 Herstellungsrezepte benötigter Puffer und Lösungen

2.3.1 Narkoselösung für die Lungenfunktionsmessung

10 ml Ketamin (5 mg/ ml)

3,125 ml Rompun 2 %

Diese 5 %ige Lösung wurde vor der Applikation im Verhältnis 1 : 5 mit PBS verdünnt.

Pro Tier wurden 50 µl verabreicht.

2.3.2 Lösungen für die Typ-II-Pneumozyten Isolation

Antikörperplatten für Typ-II-Zell Isolation (1 Platte/Tier):

Je Platte (10 cm Durchmesser):

6 ml PBS, steril

84 µl anti-mouse CD45 (0,5 mg/ ml)

32 µl anti-mouse CD16/CD32 (0,5 mg/ ml)

1 Tropfen Tween 20 Detergens

über Nacht bei 4 °C für mindestens 18 h lagern

Dispase (4 ml/Tier):

Beachte: Endkonzentration nicht >2,4 U/ ml, beachte die jeweilige

Chargenverdünnung (U/ mg)

gewünschte Menge (mg) in 1 ml Aqua dest. lösen,

mit PBS(steril) auffüllen

DNase (1,5 ml/Tier):

1,5 ml Medium I

375 µg DNase

Low-Melt-Agarose 1 %:

0,5 g Agarose in 50 ml PBS geben, sorgfältig aufkochen und im Wasserbad bei 40 °C inkubieren

Medium I (DMEM/25 mmol/l HEPES):

500 ml DMEM (Low Glucose)

1,75 g Glucose

146 mg L-Glutamin (2 mmol/l)

Dieser Mischung werden 12,5 ml entnommen,

12,5 ml HEPES (1 M) werden daraufhin hinzugegeben.

Medium II (DMEM/25 mmol HEPES + 10 % FCS + Gentamicin/Penicillin G):

500 ml Medium I

50 ml FCS (sterifiltriert)

0,55 ml Gentamicin (10 mg/ml)

0,55 ml Penicillin G (100.000 I.E./ml)

Narkoselösung (1 ml; 0,2 ml/Tier):

0,2 ml Narcoren

0,2 ml Liquemin

0,6 ml NaCl (0,9 %)

2.3.3 Lösungen für die immunhistochemische Färbung

3 % H₂O₂-Methanolgemisch (200 ml):

Cave: Flüchtig; Lichtschutz beachten

20 ml H₂O₂-Lsg. (30 %)

180 ml Methanol

0,01 % Natrium-Citratpuffer (ca. 1 l):

2,941 g Trinatriumcitratdihydrat

1 l Aqua dest.

mit HCl- Lsg. (1 mol/l) pH 6 einstellen

2.3.4 Lösungen für die SDS-Polyacrylamid Gele

Substanzen werden zunächst ohne SDS in etwas Aqua dest. gelöst, anschließend wird SDS dazugegeben, der gewünschten pH- Wert eingestellt und mit Aqua dest. aufgefüllt.

Solution 2 :

Substanz	100 ml	200 ml
Tris-Base, 1,5 mol/l	18,7 g	37,4 g
EDTA , 8mmol/l	0,3 g	0,6 g
SDS 0,4 %-ig	0,4 g	0,8 g

pH 8,8 mit HCl-Lsg. (2 mol/l) einstellen

Solution 3:

Substanz	100 ml	200 ml
0,5mol/l Tris-HCl	6,2 g	12,4 g
EDTA, 8 mmol/ l	0,3 g	0,6 g
SDS 0,4 %-ig	0,4 g	0,8 g

pH 6,8 mit NaOH- Lsg. (1 mol/l) einstellen

2.3.5 Lösungen für die Gel- Elektrophorese

Dissoziationspuffer (Anteil der Bestandteile, Mengenbedarf variabel):

Tris-HCl, 30mmol/l (pH 7,4 mit Na-OH- Lsg. (1 mol/l) austitrieren)

15 % Glycerin

3 % SDS

0,04 % Bromphenolblau

10 % Mercaptoethanol

Elektrophoresepuffer (für 2 Liter, pH 8,6):

30 g Glyzin

10 g Tris-Base

3 g SDS

zunächst in wenig Aqua dest. lösen, dann auf 2 Liter auffüllen, pH kontrollieren

2.3.6 Lösungen für den Western-Blot

Blotpuffer A und B (für jeweils 2 l)

Puffer A (pH 9):

600 ml Aqua dest.

400 ml Methanol abs.

6,2 g Borsäure (50 mmol/l)

pH Einstellung mittels Natronlauge (1mol/l), mit Aqua dest. auf 2 Liter auffüllen

Puffer B (pH 9):

600 ml Aqua dest.

100 ml Methanol abs. (5 % Anteil)

6,2 g Borsäure (50 mmol/l)

pH Einstellung mittels Natronlauge (1mol/l), mit Aqua dest. auf 2 Liter auffüllen

2.3.7 Lösungen für die Gelfärbung

Färbelösung für die Proteingele:

1 g Coomassie-Blue

400 ml Methanol

100 ml Eisessig

500 ml Aqua dest.

Entfärberlösung:

300 ml Methanol

100 ml Eisessig

500 ml Aqua dest.

2.4 Computerprogramme

Abbildungen	Adobe Acrobat 7.0, Adobe Inc., Microsoft Power Point 2007, Microsoft
Bestimmung der RNA-Quantität	Nanodrop® ND-1000 Software, NanoDrop, Wilmington, USA
Histologie/Zytologie Auswertung	Image Pro Discovery, MediaCybernetics, Bethesda, USA
Literaturrecherchen	PubMed.gov, Medline.de
Lungenfunktionsanalysen- Software	Flexi vent snap shot 150, Scireq, Paris, Fr
PCR- Software "Rotor-Gene-Q"	Qiagen GmbH, Hilden
Statistik	GraphPad Prism®, GraphPad Software La Jolla, USA
Tabellen	Microsoft® Excel for Windows, MS Office 2007
Textverarbeitung	Microsoft® Word for Windows, MS Office 2007

3 Methoden

3.1 Versuchstiere und Haltung

<u>Stamm</u>	<u>Herkunft</u>
BALB/c	Charles River Laboratories, Sulzfeld
C57BL6 (B6)	Charles River Laboratories, Sulzfeld

Bei C57BL6- und BALB/c-Tieren handelt es sich um Inzuchtlinien nahezu identischen Genotyps. Die schwarze C57BL6-Rasse findet weltweit vielseitigen Einsatz in der Forschung und zeichnet sich durch ihre Robustheit aus. Sie bildet zudem den meist genutzten „genetischen Hintergrund“, um durch gezielte Aberrationen Modellorganismen menschlicher Erkrankungen zu erhalten. Auch die BALB/c-Tiere, eine Albino-Rasse, zählt zu den meist Verwendeten in der tierexperimentellen Forschung, insbesondere eignet sie sich für immunologische und onkologische Untersuchungen (s.auch Abs. 5.1.1).

Die Tierhaltung erfolgte im Biomedizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Universität Marburg durch qualifiziertes Tierpflegepersonal. Die Haltungsanlage genügte den S2- und S3-Bedingungen nach GenTSV. Die Mäuse wurden in spezifisch pathogenfreien, einzelbelüfteten Käfigsystemen (IVC-Racks) mit direkter Anbindung an zentrale, gefilterte Luftversorgung gehalten. Die standardisierte Raumtemperatur lag bei 21 °C, die Luftfeuchtigkeit bei 55 %, das Hell-Dunkel-Lichtprogramm bei 12 Std. (Helligkeit von 6 bis 18 Uhr). Pro Käfig (Weichholzfaser-Einstreu AB8, Firma AsBe-wood GmbH) wurden maximal 5 Tiere gehalten. Die Tiere erhielten allergenfreies Wasser und Futter ad libidum. Für die Versuche verwendete man ausschließlich 8 bis 10 Wochen alte weibliche BALB/c- und C57BL6-Tiere mit ähnlichem Gewicht von ca. 20 Gramm.

Tierversuchsgenehmigung

Alle beschriebenen in-vivo Studien wurden im Rahmen der Tierversuchsgenehmigung unter wissenschaftlichen und ethischen Aspekten durch das Regierungspräsidium Gießen begutachtet und legitimiert (Genehmigungs-Nr.: MR 20/11 - Nr. 38/2008).

3.1.1 Erzeugung einer akut-allergischen Atemwegsreaktion

3.2.1 Substanzen, Behandlungsgruppen und Versuchsschemata

Insgesamt wurden 282 Tiere im Zeitraum von Ende des Jahres 2008 bis Mitte des Jahres 2011 untersucht. Folgende Allergene und Substanzen kamen bei der Sensibilisierung und Provokation der Versuchstiere zum Einsatz:

Phosphate buffered saline (PBS)

Ovalbumin (OVA)

OVA, nitriert (nOVA)

Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH)

KLH, nitriert (nKLH)

Polytyrosin, nitriert (nPT)

Erzeugung einer akut-allergischen Reaktion der C57BL6-Tiere mittels Sensibilisierung und Provokation:

Die Behandlungsschemata der C57BL6-Tiere sind in den Tabellen 1 und 2 dargestellt. Pro Kombination wurden 24 C57BL6-Tiere (Sensibilisierung / Provokation) verwendet.

Tabelle 1: Behandlungsschema der C57BL6-Tiere

Sensibilisierung	Provokation
PBS	PBS
PBS	OVA
OVA	OVA
PBS	nOVA
OVA	nOVA
nOVA	nOVA

Bei untenstehenden Kombinationen wurden 12 C57BL6-Tiere pro Kombination verwendet. Somit wurden insgesamt 228 C57BL6-Mäuse untersucht.

Tabelle 2: Behandlungsschema der C57BL6 Tiere

Sensibilisierung	Provokation
PBS	KLH
PBS	nKLH
OVA	KLH
OVA	nKLH
nOVA	KLH
nOVA	nKLH
nKLH	nKLH

Erzeugung einer akut-allergischen Reaktion der BALB/c-Tiere mittels Sensibilisierung und Provokation:

Die Behandlungsschemata der BALB/c-Tiere sind in Tabelle 3 dargestellt. Es wurden 8 BALB/c-Tiere pro Kombination sensibilisiert und provoziert. Zudem verwendete man hier nitriertes Polytyrosin (nPT) als Vergleichssubstanz, um dessen Wirkung auf die Atemwege zu testen. Insgesamt wurden 54 BALB/c-Tiere untersucht.

Tabelle 3: Behandlungsschema der BALB/c-Tiere

Sensibilisierung	Provokation
PBS	PBS
OVA	OVA
nOVA	nOVA
nOVA	nKLH
nKLH	nOVA
nKLH	nKLH
nPT	nKLH
nPT	nPT

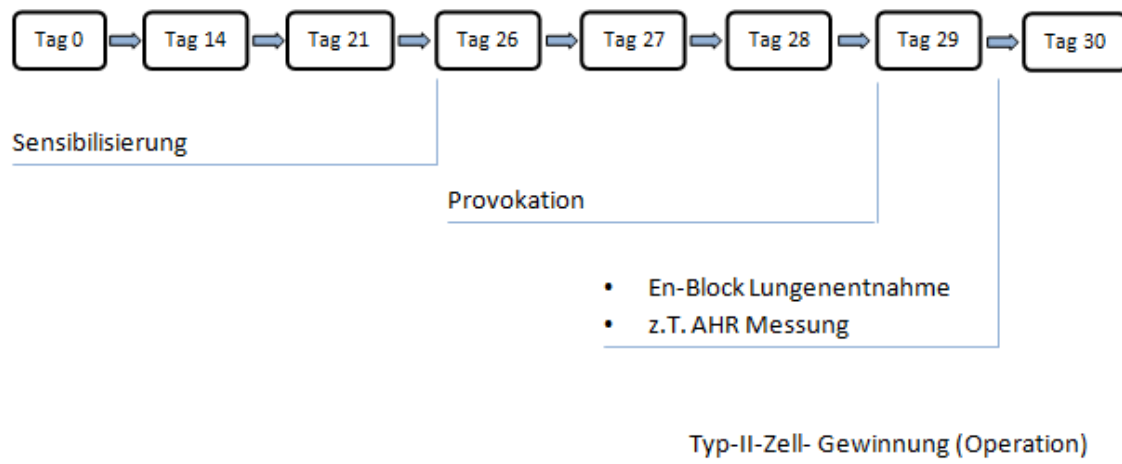


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs

3.2.2 Sensibilisierung

Die systemische Sensibilisierung bildete die Grundvoraussetzung für die Etablierung einer akuten Entzündungsreaktion in der Lunge. Im Maus-Modell wurde diese Sensibilisierungsreaktion durch drei intra-peritoneale (i.p.) Injektionen hervorgerufen.

An den Versuchstagen (s. Abb. 6) wurde jedem Versuchstier 0,2 µl eines Allergens in 130 µl PBS in Verbindung mit 70 µl des Adjuvans Aluminiumhydroxyd $\text{Al}(\text{OH})_3$ gespritzt, insgesamt ca. 200 µl Lösung pro Tier.

Innerhalb der Inkubationszeit von ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte die Bindung des Allergens an das Adjuvans im Gemisch.

Beispiel: Ansatz für 20 Tiere:

4,0 µl	OVA
1,4 ml	$\text{Al}(\text{OH})_3$
2,6 ml	PBS

Den Kontrolltieren wurden 200 µl PBS i.p. verabreicht.

3.2.3 Provokation

Nach der vorhergegangenen Sensibilisierung kamen bei der Provokation die Atemwege der Tiere mit dem jeweiligen Allergen in direkten Kontakt, um eine allergische Reaktion auszulösen. Hierfür wurden maximal 8 Mäuse in einer luftdichten Acrylkammer (20 x 20 x 15 cm, Weichholzeinstreu) untergebracht. Die Tiere setzte man für 20 Minuten einem allergenhaltigen Aerosol (z.B. aus 1 % OVA in PBS gelöst)

aus. Erzeugt von einem Düsengenerator, strömte das Aerosol direkt in die Kammer. Diese Prozedur wiederholte sich an Tag 26, 27 und 28 des Versuchsplanes zur gleichen Uhrzeit (s. Abb. 6). Die Kontrolltieren inhalierten ein PBS-Aerosol ohne Allergenzusatz.

3.3 Lungenfunktionsmessung

An Tag 29 des Protokolls wurde mit einigen C57BL6-Tiere einer Versuchskombination (Sensibilisierung / Provokation) die invasive Lungenfunktion an der anästhesierten Maus (Drazen J M, 1999) durchgeführt.

Für die invasive Messung der Atemwegshyperreagibilität (AHR) wurde die Luftröhre der Mäuse mit einem computerkontrollierten Kleintier-Kolbenhub-Respirator (FlexiVent-System) verbunden. Bei diesem System diente der Respirator als Signalgeber und Messgerät zugleich. Das Atemzugvolumen ließ sich durch die Dislokation des Kolbens bestimmen und der Atemwegsdruck konnte über einen Sideport am Kolben mittels eines Druckwandlers gemessen werden. Über die Position des Kolbens wurde zudem das zugeführte Volumen, der hierbei benötigte Druck, sowie die Stromgeschwindigkeit der Atemluft (Flow) ermittelt.

24 h nach der letzten Allergenprovokation wurden die Tiere durch i.p. Injektion von 50 µl Narkoselösung (s. Rezepte, Abs. 2.3.1) anästhesiert. Nach vollständigem Erlöschen der Reflexe präparierte man die Trachea der Tiere frei. Das Tier wurde hierfür an den Extremitäten auf einer Styroporfläche fixiert, der Hals überstreckt mit einer Nadelkanüle festgesteckt. Die Verletzung der zervikalen Gefäße wurde vermieden, um einen starken Blutverlust und den Tod der Tiere vor Messungsabschluss zu verhindern. Die Tracheostomie erfolgte mit einer 20-Gauge Stahlkanüle die in der Trachea platziert, mit Nahtmaterial fixiert und an das FlexiVent-System angeschlossen wurde. Die Muskelrelaxation des Tieres bewirkte die Gabe von 50 µg Esmeron intra-muskulär (i.m.). So konnte die spontane Gegenatmung verhindert werden, welche die Messung verfälscht hätte. Die mechanische Ventilation erfolgte mit einer Beatmungsfrequenz von 120/min volumenkontrolliert und drucklimitiert bei einem Tidalvolumen (TV) von 10 ml/kg, einem maximalen Druck (Pmax) von 30 cmH₂O und einem positive endexpiratorische Druck (PEEP) von 3 cmH₂O.

Nach Abflachen der spontanen Atmung vernebelte man ein Gemisch aus ca. 35 μ l PBS und dem Acetylcholin-Analogon Methacholin für 10 sec und bestimmte nach jeweils 1 min sowohl die Resistance als auch Compliance, PEEP und P_{\max} .

Die Methacholinkonzentration der Mischung wurde von 1 mg/ ml bei den folgenden fünf Messungen gesteigert (2,5 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml). Im Anschluss erfolgte die en bloc-Resektion der Lunge und die Fixation in 4 % Formaldehyd.

Den C57BL6-Tieren, die man keiner AHR-Messung unterzog, entnahm man nach der Anästhesie und dem Erlöschen der Reflexe die Lungen direkt und fixierte sie.

Durch die freundliche Unterstützung des hausinternen, pathologischen Instituts wurden die Lungen daraufhin entwässert und in Paraffin eingebettet.

3.4 Typ-II-Zell Isolierung, Gewinnung der Lavage

An Tag 30 des Protokolls wurde mit den verbliebenen Tieren beider Stämme eine Operation zur Typ-II-Zell-Gewinnung durchgeführt. Sie beruht auf einem etablierten Verfahren (Corti M et al., 1996).

Die benötigten Antikörperplatten und Medien wurden am Vortag, Tag 29, vorbereitet (s. Rezepte, Abs.2.3.2).

Die Operation zur Lungenentnahme

Nach Verabreichung des anästhetischen Gemisches (s. Abs.: 2.3.2) und dem Erlöschen der Reflexe wurde ein Tier auf einer Styroporplatte mit Nadelkanülen fixiert. Es folgte die chirurgische Darstellung der Trachea, Insertion einer 20 G Kanüle als Trachealtubus und deren Sicherung mit Nahtmaterial. Zur Gewinnung der bronchoalveoläre Lavage (BAL) spülte man die Lunge mit 1 ml 0,9 % NaCl und lagerte das gewonnene Material bis zur Weiterverarbeitung auf Eis.

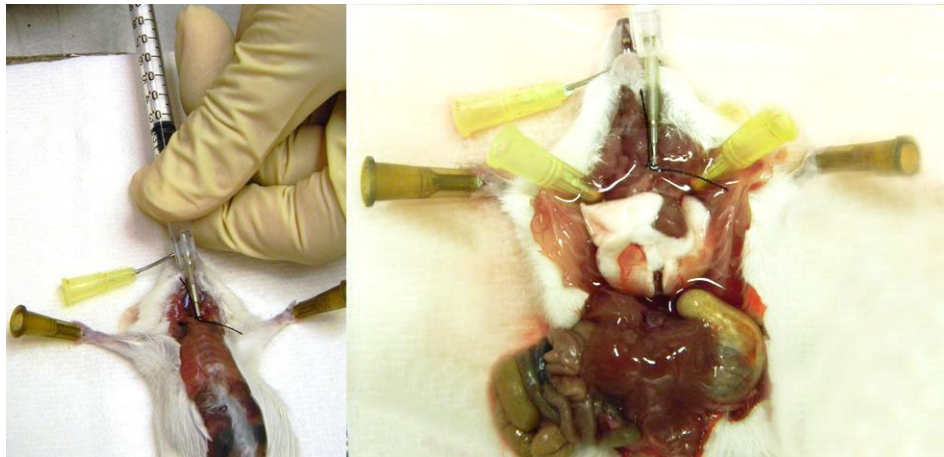


Abbildung 7: Operation zur Typ-II-Zell- und Lavage-Gewinnung, li.: Lavage-Entnahme, re.: Ansicht einer blutleer gespülten Lunge

Es folgte die Eröffnung des Abdomes durch eine vertikale, mediane Laparotomie. Nach Darstellung und Durchtrennung eines großen Iliakalgefäßes wurde das austretende Blut abpipettiert und gesammelt. Durch vorsichtiges Ablösen des Diaphragmas kollabierten beide Lungenflügel, so dass eine mediane Thorakotomie ohne Verletzung des Lungenparenchyms durchgeführt werden konnte. Zur besseren Übersicht des Operationsgebietes wurde der Thymus entfernt.

Ein Infusionsbesteck mit NaCl-Lösung 0,9 % war oberhalb des Operationsbereiches befestigt. Nach Darstellung der Thoraxorgane, erfolgte eine kleine Inzision in den rechten Ventrikel. In diese Öffnung des Ventrikels wurde die Spitze der Infusomatleitung platziert und die Lungenstrohmbahn mit NaCl-Lösung blutleer gespült. Zum Abfluss von Blut und Lösung erfolgte die Eröffnung des linken Atriums. Während der Spülung wurden die Atemwege und Alveolen ca. alle 3 Sekunden mit Hilfe einer auf die Trachealkanüle aufgesetzten Spritze (Raumluft) vorsichtig gebläht. Daraufhin instillierte man über den Trachealtubus 1-2 ml Dispase, direkt gefolgt von 0,45 ml 1 % Low-Melt-Agarose. Zur Aushärtungsbeschleunigung der Agarose wurde die Lunge für 2 Minuten mit Eis bedeckt. Nach Ablauf der Inkubationszeit (IKZ) konnten die Lungenflügel entnommen werden.

Die Verarbeitung des Lungengewebes zur Typ-II-Zell Gewinnung

Die Lunge wurde in 2 ml Dispase für 45 min bei Raumtemperatur angedaut. Anschließend entfernte man verbliebene Trachea- oder Herzgewebsreste und versetzte das Lungengewebe mit 1,5 ml Medium I + 250 µg/ml DNase. Man zerkleinerte es 10 min mit der Schere und schüttelte es weitere 5 min per Hand.

Das entstandene Zellgemisch wurde über Filter mit abnehmender Porengröße (2x Mull, Gaze: 150 µm, 50 µm und 20 µm) gegeben und mit 7 ml Medium I nachgespült. Die Typ-II-Zellen aus der Lunge eines Versuchstieres befanden sich im Filtrat.

Es wurde für 10 min bei 130 x g und 4 °C zentrifugiert. In der Zwischenzeit erfolgte das zweimalige Waschen der am Vortag präparierten AK-Platten mit Medium I. Nach der Zentrifugation entfernte man den zellfreien Überstand. Es folgte die Resuspension des Bodensatzes mit 10 ml Medium II und der Auftrag dieser Zell-Mischung auf die Antikörperplatten, um diese für 2 Stunden bei 37 °C zu inkubieren.

Ziel dieses Arbeitsschritts war Leukozyten wie Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten/Makrophagen durch deren Oberflächenbindung an die Antikörper auf der Platte von den Typ-II-Zellen zu isolieren. Die Typ-II-Zellen gingen mit den Antikörpern auf der Platte keine Bindung ein und konnten nach der Inkubation samt Nährlösung von der Platte genommen werden.

Die Proben wurden erneut für 10 min bei 130 x g und 4 °C zentrifugiert und anschließend mit 10 ml 1x PBS resuspendiert.

3.4.1 Zellzählung

50 µl der Zellsuspension versetzte man zur Färbung mit 200 µl Trypan Blue und gab sie in eine Neubauer-Zählkammer. Das Trypanblau diente zur Vitalfärbung der Typ-II-Zellen, da die Substanz von den lebenden Zellen nicht aufgenommen wird. Abgestorbenen Zellen werden vom Farbstoff jedoch penetriert und färben sich dunkelblau. Solche und andere nicht viable Zellen schloss man von der Zählung aus.

Die Auszählung der Zellen erfolgte bei 100-facher Vergrößerung. Es wurden 16 Einzelquadrate bzw. 1 Eckfeld von 4 Eckfeldern ausgezählt, die Zellzahlen der Proben der einzelnen Tiere lagen durchschnittlich bei 60 bis 300 Zellen. Zur Ermittlung der totalen Zellzahl pro Milliliter wurden die gezählten Zellen demnach durch 4 geteilt, das Ergebnis mit dem Verdünnungsfaktor 5 (Zähllösung) und dem Kammervolumenfaktor (1×10^4) multipliziert.

Insgesamt wurden 10 ml Zellsuspension verwendet. Das Ergebnis wurde entsprechend mit 10 multipliziert, um die Gesamtzahl der gewonnenen Typ-II-Zellen einer Lunge zu ermitteln.

Somit lautet die angewandte Formel zur Errechnung der von einem Versuchstier gewonnenen Typ-II-Zellen:

$$\frac{x_{(\text{zellzahl})}}{4} \times 5 \times 10^4 \times 10$$

Den Großteil der Zell-Suspension, der nicht der Zählung diene, zentrifugierte man erneut und verwarf den Überstand. Der Bodensatz wurde in einer Konzentration von 5 bis 10×10^6 Zellen pro Milliliter Trizol aufgenommen und bei -80 °C bis zur Protein- und RNA-Aufreinigung (s. Abs.2 7.1) gelagert.

3.5 Verarbeitung der broncho-alveolären Lavage (BAL)

Die Atemwege wurden über die Trachealkanüle mit 1 ml NaCl 0,9 % gespült, die Lavage auf Eis gelagert.

Nach einer 10 minütigen Zentrifugation bei 200 g und 4 °C dekantierte man den zellfreien Überstand in ein separates Tube. Er lagerte bis zur Proteinbestimmung bei -20 °C. Das Zellpellet resuspendierte man für die Zytospinpräparation mit 500 µl NaCl-Lösung.

3.5.1 Zytospinpräparation

Für die Analyse der zellulären Zusammensetzung der Lavage wurde diese mittels Zyto-Zentrifuge für 15 min bei 64 g auf einen Objektträger gebracht und nach 24-stündiger Trocknung nach Pappenheim gefärbt. Die gefärbten Zytospinpräparate untersuchte man mikroskopisch auf ihren Gehalt an Makrophagen, Lymphozyten, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten. Die Auszählung der Zellen erfolgte „blind“, ohne Kenntnis über die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Versuchsgruppe. Zur Beurteilung der Zellpopulation wurden eosinophile Granulozyten, neutrophile Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten durch die Auszählung von 5 inkongruenten Gesichtsfeldern bei 200-facher Vergrößerung quantifiziert. Man ermittelte die Gesamtzellzahlen innerhalb jeder Versuchsgruppe.

3.5.2 Färbung nach Pappenheim

- Die Objektträger inkubierten 5 min in gebrauchsfertiger May-Grünwald Lösung, kurze Spülung Aqua dest.
- 20 min IKZ in verdünnter Giemsa-Lösung (im Verhältnis 1:25 mit Aqua dest.), Spülung mit Aqua dest.

Nach vollständiger Trocknung wurden die Präparate mit 1-2 Tropfen Corbitbalsam versehen und mit einem Deckglas eingedeckt. Zur Aushärtung/Fixierung lagerten die Präparate mehrere Stunden vor der mikroskopischen Auswertung.

3.5.3 Proteinkonzentrationsbestimmung der zellfreien BAL

Der BCA-Protein Assay basierte auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} durch die in der Probe enthalten Proteine. Die Reduktion findet in stark alkalischem Milieu statt (pH 11). Die Menge des entstandenen Reduktats ist proportional zum Proteingehalt der Probe. Das entstandene Kupfer-Kation bildet mit bicinchoninischer Säure („bicinchoninic acid“, BCA) einen Chelatkomplex. Das Absorptionsmaximum dieses violett gefärbten Produkts liegt bei einer Wellenlänge von 562 nm. Es können Proteinkonzentrationen im linearen Messbereich von 20 $\mu\text{g/ml}$ bis 2000 $\mu\text{g/ml}$ photometrisch bestimmt werden.

Durchführung

Jeweils 10 μl der zellfreien Lavageflüssigkeit setzte man unverdünnt ein. Der BCA Protein Assay Kit wurde entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Die Proteinstandardreihen, mit einem Konzentrationsbereich von 25 $\mu\text{g/ml}$ bis 2000 $\mu\text{g/ml}$, setzte man in den zum jeweiligen Enzymassay gehörenden Standardpuffern an. Das im Folgenden für alle Proben benötigte BCA-Working-Reagens entstand durch die Mischung des BCA-Reagens B mit BCA-Reagens A im Verhältnis 1 : 50.

Die 10 μl der Lavageflüssigkeit, der Standardansätze und des für die Leerwertbestimmung eingesetzten Standardpuffer - alle Proben in Doppelbestimmung - pipettierte man auf eine Mikrotiterplatte. Sie wurden mit 200 μl des BCA-Working-Reagens durch Schütteln (30 sec) vermischt.

Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 37 °C und einer anschließenden 15 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur konnten die Absorptionen der Doppelbestimmungen bei 562 nm photometrisch gemessen werden. Die Messwerte

der Protein-Standardreihen ergaben eine Standardkurve anhand derer die Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben bestimmt wurden.

3.6 Herstellung histologischer und immunhistochemischer Präparate

Die paraffinierten Lungen-Blöcke der Tiere einer Versuchsgruppe wurden zur Anfertigung histologischer Präparate verwendet. Die Blöcke lagerten zunächst für 24 Stunden bei -4 °C. Anschließend konnten sie mittels eines Mikrotoms eingeschnitten werden. Sobald ein aussagekräftiger Queranschnitt beider Lungenflügel erreicht war, wurden 1-2 µm feine Gewebeschnitte abgetragen und mit dem Pinsel in ein Wasserbad mit RT überführt. Hatte man 6 bis 8 Schnitte einer Lunge gesammelt, lagerten sie zum Strecken/Entfalten für wenige Minuten in einem 40 °C warmen Wasserbad. Nach dem Abfischen mit Hilfe eines Objektträgers erfolgte die Trocknung für 24 h bei 37 °C bzw. für 2 h bei 60 °C.

3.6.1 Entparaffinierung, Rehydrierung und Hämalaun-Eosin (HE)-Färbung von Gewebeschnitten

Die trockenen Gewebeschnitte mussten für die Färbung zunächst entparaffiniert und rehydriert werden. Mehrere Objektträger wurden hierfür insgesamt 10 min in zwei mit Xylol gefüllte Küvetten getaucht, jeweils 5 Minuten pro Küvette. Nach der Entparaffinierung folgte die Rehydrierung der Schnitte für die hydrophile Hämalaun-Färbung.

Hierfür wurden die Präparate in Lösungen mit absteigendem Alkoholgehalt inkubiert:

2 min in 100 %igem Ethanol

2 min in 96 %iger Alkohollösung

1 min in 80 %iger- und

1 min in 70 %iger Alkohollösung

Daraufhin wurden die Präparate für 30 sec in Aqua dest. getaucht und konnten anschließend für 30 sec mit der gebrauchsfertigen Hämalaun-Lösung gefärbt werden. Nach Ablauf der Färbezeit ließ man die Objektträger in der Küvette unter fließendem, lauwarmem Wasser für 1 min Bläuen und spülte sie mit Aqua dest.

Für die Eosin-Färbung wurden die Präparate in Lösungen mit ansteigendem Ethanolgehalt getaucht:

1 min in 70 %iger Lösung

1 min 80 %iger Lösung

2 Minuten in 96 %iger Lösung.

Daraufhin wurden die Objektträger 15 sec in der alkoholischen Eosin-Lösung gefärbt. Es folgten 2 Entwässerungsschritte durch die jeweils 2 minütigen Inkubationen in 96 %igem und 100 %igem Ethanol. Zum Abschluss der HE-Färbung wurden die Objektträger für 10 Minuten in Xylol gelagert, getrocknet und mit Corbit-Balsam eingedeckt. Die mikroskopische Auswertung war nach der Aushärtung des Corbits möglich.

3.6.2 Immunhistochemische Detektion

Die Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte erfolgte nach ähnlichem Schema. Erst erfolgte die Inkubation in Xylol für 10 Minuten. Der absteigenden Alkoholreihe wurde 50 %ige EtOH-Lösung hinzugefügt. Die Präparate wurden demnach jeweils 3 Minuten in 100 %iger-, 96 %iger-, 80 %iger-, 70 %iger- und 50 %iger Lösung gelagert.

Zur Antigen-Demaskierung wurden die Präparate in Natrium-Citratpufferlösung (s. Abs. 2.3.3) 2 x 5 min bei 150 Watt erwärmt (Mikrowelle), dann 2 x 5 min bei 400 Watt sprudelnd aufgekocht. Nach 30 min Abkühlzeit spülte man sie kurz mit Aqua dest.. Es folgten 5 min Inkubation im H₂O₂-Methanolgemisch (s. Abs. 2.3.3). Dies diente der Blockierung der endogenen Peroxidase (Vorkommen z.B. in Erythrozyten und Granulozyten), um bei der folgenden immunhistochemischen Detektionsfärbung falsch positive Ergebnisse durch unspezifische Bindung zu vermeiden. Anschließend wurden die Präparate rehydriert. Nach Rehydration der Präparate (3-malige Lagerung für jeweils 2 min in 1 x PBS) wurden sie mit Lösung A (Serum-Blocking-Solution) des Histostain® SP Kits bedeckt und 10 min inkubiert. Man dekantierte die Flüssigkeit, bevor die jeweilige Primär-Antikörperlösung (ca. 200µl) auf das Präparat gegeben wurde, siehe Tabelle 4. Es folgte die Inkubation über Nacht bei 4 °C.

Zur Positivkontrolle diente ein Antikörper gegen das Strukturprotein β -Aktin, da es in allen eukaryotischen Zelle vertretenen ist. Die Negativkontrolle bildete ein mit 200 μ l 1x PBS bedecktes Präparats.

Tabelle 4: Primär-Antikörper und eingesetzte Verdünnung für die Enzym-Detektion mittels Immunhistologie

Primär-Antikörper	Verdünnung
Anti- β -Aktin	1 : 2000
Anti-GR	1 : 500
Anti-Gpx3	1 : 1000
Anti-Gpx4	1 : 80

Am folgenden Tag konnte die Primär-Antikörperlösung von den Objektträgern dekantiert werden. Es wurde

3x für jeweils 2 min mit 1 x PBS gewaschen,

Lösung 1B (biotinylierter Sekundär-Antikörper) für 10 min aufgetragen,

3x für jeweils 2 min mit 1 x PBS gewaschen,

Lösung 2 (Streptavidin-Peroxidase-Konjugat) für 10 min aufgetragen,

3x für jeweils 2 min mit 1 x PBS gewaschen,

Lösung 3 (Substrat/Chromogen) für 5-10 min aufgetragen.

Im Anschluss spülte man die Präparate mit Aqua dest., bedeckte sie für 30 Sekunden mit Lösung 4 (Hämalaun) und ließ sie unter fließendem Leitungswasser bläuen. Das Eindecken erfolgte mit dem wasserlöslichen Eindeckmedium Aquatex[®]. Nach der Aushärtung (24 h bei RT bzw. 30 Minuten bei 60 °C) war die mikroskopische Auswertung möglich.

3.7 RNA- und Proteingewinnung aus den Typ-II-Pneumozyten

3.7.1 RNA- und Proteinaufreinigung

Nach der in Absatz 2.4 beschriebenen Typ-II-Zell Isolation wurden die in 1 ml Trizol aufgenommen und bei -80 °C gelagerten Zellpellets ca. 5 min bei RT (15-30 °C) aufgetaut. Zu jeder Probe wurden 200 μ l Chloroform gegeben, die Mischung dann 15

sec gevortext und 3 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Tubes für 15 min mit 1200 g bei 4 °C zentrifugiert.

Die wässrige Phase, in der die RNA gelöst war, wurde in ein neues Tube pipettiert. Die organische Phase, welche die Proteine enthielt, lagerte bis zur Weiterverarbeitung (direkt im Anschluss an die RNA-Aufreinigung) bei 4 °C.

Um die RNA aus der wässrigen Phase zu fällen, wurde diese mit jeweils 500 µl Isopropanol versetzt, gevortext und 10 min bei RT inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 15 min mit 1200 g bei 4 °C. Der Überstand wurde vorsichtig abgeschüttet und die entstandenen Zellpellets einmal mit je 1 ml 75 %igem Ethanol gewaschen. Nun folgte eine 5 minütige Zentrifugation bei 7500 g und 4 °C, die Verwerfung des Überstandes und die Lufttrocknung der Pellets für ca. 15 min bei RT. Anschließend wurden die RNA-Proben in 30 µl Aqua dest. aufgenommen, 10 min bei 55 °C auf dem Heizblock inkubiert und kurz abzentrifugiert. Nun konnten Reinheitsgrad und Konzentration der Proben bestimmt werden (Abs. 3.8).

3.7.2 Protein Aufreinigung

Die organische Phase der jeweiligen Proben, welche die Proteine enthielt, war bei 4 °C zwischengelagert worden (Abs.2.7.1).

Man fügte 300 µl 100 %igem Ethanol hinzu, lagerte die Proben für 3 min bei RT, zentrifugierte sie für 5 min bei 4 °C und 2000 g und verwarf das DNA- Pellet. Den Protein-Überstand der jeweiligen Probe teilte man in 2 Tubes auf und mischte 750 µl Isopropanol unter alle entstandenen Tubes. Die Tubes inkubierten 10 min bei RT, wurden 10 min bei 4 °C und 12000 g zentrifugiert, der Überstand dekantiert. Es folgten 3 Waschrritte mit 1 ml Ethanol, welches 0,3 mol/l Guanidinhydrochlorid enthielt. Die IKZ pro Waschschritt betrug 20 min bei RT, gefolgt von jeweils 5 minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 7500g und Dekantieren des Überstandes. Nun wurden die Pellets mit 1 ml 100 %igem Ethanol resuspendiert, 20 min bei RT inkubiert und zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes ließ man das Proteinpellet für ca. 10 min lufttrocknen. 50 ml 1 % Sodiumdodecylsulfat (SDS)-Lösung wurden mit einer Tablette Proteaseinhibitor angesetzt. 50 µl dieser Lösung und 2 µl NaOH-Lösung gab man daraufhin in jedes Tube. Sobald sich die Pellets gelöst hatten, konnten die zwei Tubes derselben Proben wieder zusammengefügt werden.

Anschließend wurden alle Tubes bei 50 °C für 10 min auf dem Heizblock inkubiert und unlösliches Material bei 10000 g für 5 min und 10 °C abzentrifugiert.

Den aufgereinigten, proteinhaltigen Überstand überführte man in ein weiteres Tube und lagerte ihn bis zur Konzentrationsbestimmung (Abs. 3.9) bei -20 °C.

3.8 Reinheitsgrad- und Konzentrationsmessung der RNA-Proben

Um bei der cDNA-Synthese von jeder Probe exakt die gleiche RNA-Menge einsetzen zu können, musste die RNA-Konzentration der jeweiligen Probe und ihre Qualität zu bestimmt werden.

Hierfür wurde ein Nanodrop Spektralphotometer mit dazugehöriger Software eingesetzt. Es ermöglicht die Messung im Bereich von 220 bis 320 nm bei einem Minimalvolumen von 1 µl pro Probe. Zur Initialisierung wurde 1 µl Rnase-freies Wasser auf den Probenteller pipettiert, vermessen und entfernt.

Nun konnten jeweils 1 µl der Proben gemessen werden, um ihre Konzentration zu bestimmen und Verunreinigungen durch verbliebene Proteine festzustellen. Da das Absorptionsmaximum für Proteine bei 280 nm liegt, das Absorptionsmaximum reiner RNA jedoch bei 260 nm, zeigte das Verhältnis 260 : 280 an, wie stark eine RNA-Lösung durch Reste von Proteinen verunreinigt war. Ein Verhältnis von 2,0 gilt als ideal. Für die cDNA-Synthese wurden nur Proben weiterverarbeitet, deren Reinheitsquotient im Toleranzbereich von 1,6 bis 2 lag.

Die gemessenen RNA-Proben lagerten bis zum Zeitpunkt der cDNA-Synthese (Abs. 3.11) bei -80 °C.

3.9 Konzentrationsbestimmung des Typ-II-Zell Proteins

Zur Messung des Proteingehalts aus den Typ-II-Zellen wurde das BCA-Protein Assay Kit verwendet, Funktionsweise und Durchführung wurden in Abschnitt 3.5.3 (Proteinkonzentrationsbestimmung der BAL) beschrieben. Man arbeitete hier mit einer 1 : 10 verdünnten Probe (1 µl Probe + 9 µl Aqua dest.). Dieser Schritt ermöglichte den Einsatz gleicher Proteinmengen bei Gelelektrophorese und Westernblot.

3.10 Western Blot der aufgereinigten Typ-II-Zell Proteine

Um einen Western Blot mit anschließender Antikörperdetektion durchführen zu können, mussten zunächst die Gele hergestellt und die Gelelektrophorese durchgeführt werden.

3.10.1 Gel Herstellung

1. Trenngelzusammensetzung für 12 %ige Acrylamidgele (für 4-6 Gele, ca. 6 ml/Gel):

Solution 1 (Rotiphoese, gebrauchsfertig)	18 ml
Solution 2 (s. Abs. 1.3.4.)	11,2 ml
Aqua dest.	15,8 ml
APS (10 %)	300 µl
TEMED	30 µl

Man gab ca. 6 ml der fertigen Gellösung zwischen die Glasplatten, die Polymerisationszeit betrug etwa 30 min. Währenddessen ließ die Übersichtung mit 2 ml Isopropylalkohol eine glatte Gel-Oberfläche entstehen, der Alkohol wurde anschließend dekantiert.

2. Sammelgel (für 2-4Gele rund 2,5 ml/Gel):

Solution 1 (Rotiphoese)	2,4 ml
Solution 3 (s. Abs. 1.3.4.)	4,0 ml
Aqua dest.	6,8 ml
APS (10 %)	300 µl
TEMED	20 µl

Direkt nach der Aufschichtung auf das Trenngel wurden die Kämme eingesteckt, um die Geltaschen für den späteren Proteinauftrag zu formen. Nach der vollständigen Polymerisation konnten die Gele wenige Tage in feuchten Tüchern bei 4 °C gelagert werden.

3.10.2 Gelelektrophorese

Die Glasplatten mit den polymerisierten Gelen wurden in die Elektrophoresekammern eingespannt und diese zur Hälfte mit Elektrophoresepuffer (Abs.2.3.4) befüllt. Pro Geltasche setzte man 20 µg Protein einer Probe ein. Die benötigten Milliliter der jeweiligen Probe wurden in der gleichen Volumenmenge Dissoziationspuffer (Abs. 2.3.4) aufgenommen (das maximale Fassungsvermögen einer Geltasche betrug 25 µl). Die Probenansätze ruhten für 3 min bei 95 °C im Wärmeblock.

Nach Entfernung der Kämme belud man die Geltaschen. Zunächst wurden auf jedes Gel 5 µl eines Standard-Markers aufgetragen. Während der Versuchsreihen wurde vom Novex® Multicolored Standard auf die qualitativ überzeugendere PageRuler™ Prestained Protein Ladder gewechselt. Zudem wurde eine Probe des Strukturproteins β -Aktin mit gleicher Proteinkonzentration bei jedem Elektrophorese-Vorgang mit aufgetragen. Der Einsatz gleicher Proteinmengen konnte hierdurch bei der Detektion (Abs. 3.10.4) kontrolliert werden.

Einstellung des Power Supplies für die Elektrophorese von 4 Gelen

Sammlung in den Geltaschen (Sammelgel): 100 mA für 30 min

Größen-Auftrennung der enthaltenen Proteine (Trenngel): 150 mA für 45 min

3.10.3 Western Blot

Nach Beendigung der Elektrophorese entnahm man die Gele und löste sie von den Glasplatten. Bei den ersten Versuchen wurde mit einer Graphit-Trans-Blot Apparatur älteren Herstellerdatums gearbeitet (Pharmacia), die Graphitplatten mussten vor dem Blot mit Aqua dest. bedeckt und feucht gehalten werden. Da jedoch die Ergebnisse des Gel-Membran Transfers nachweislich auf Grund dieser Apparatur mäßig ausfielen, kam im Folgenden die Semi-Dry Transfer Unit w/ Powersupply TE 77XP (SERVA Electrophoresis GmbH) zum Einsatz. Die metallenen Flächen der Kathode und Anode wurden leicht befeuchtet. Auf die untere Fläche (Anode) wurden 5 in Blotpuffer A (Abs. 2.3.4) getränkte Filterpapiere (8x9 cm) gelegt.

Nun konnte die PVDF-Membran (ca. 7x8 cm) aufgelegt werden, gefolgt vom Elektrophorese-Gel. Auf das Gel legte man 5 in Blot-Puffer B getränkte Filterpapiere. Aus diesem „Paket“ wurden Lufteinschlüsse durch leichten Druck entfernt. Vier Pakete konnten zeitgleich geblottet werden. Nach Verschluss des Kathodendeckels stellte man den integrierten Powersupply auf 80 mA ein. Nach 45 Minuten war der

Proteintransfer beendet. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen auf den Membranen lagerten diese über Nacht in „The Blocking Solution“.

Kontrolle des Proteintransfers

Die Gele wurden zu Kontrolle 10 min in Coomassieblau-Färbelösung (Abs. 2.3.4) auf einem Schüttler gefärbt. Der Farbstoff dient der unspezifischen Färbung von Proteinen. Danach inkubierten die Gele für 10 min in Entfärberlösung und weitere 10 h (bzw. über Nacht) auf dem Schüttler in erneuerter Entfärberlösung. Eine sehr geringe Blaufärbung der Proteinbanden bestätigte am Folgetag den gelungenen Protein-Transfer auf die PVDF-Membran.

3.10.4 Antikörper-Detektion

Die über Nacht geblockten Membranen wurden mit 1xTBS gewaschen. Der spezifischen Erst-Antikörper war entsprechend der benötigten Verdünnung in „Low Cross Buffer“ aufgenommen worden (Tabelle 5).

Tabelle 5: Primär-Antikörper und eingesetzte Verdünnungen für die Enzym-Detektion mittels Western Blot

Primär-Antikörper	Verdünnung
Anti- β -Aktin	1:2000
Anti-GR	1:2000
Anti-GPX3	1:300
Anti-GPX4	1:500
Sekundär-Antikörper Anti-Rabbit/Mouse/Rat IgG, AP-Antibody	1:500

Die Membranen inkubierten 1h in der Erst-Antikörperlösung auf dem Schüttler. Eine Wascheinheit (5x7 min mit „Washing Buffer“) folgte. Nun konnte der Sekundär-Antikörper aufgetragen werden. Verwendet wurde ein Enzym-Antikörper-Konjugat: Anti-Rabbit/Mouse/Rat IgG Alkaline Phosphatase antibody (Ziege). Die Membranen mussten 45 min in der Lösung auf dem Schüttler inkubieren.

Während dessen konnte der Zweitantikörper an den Fc-Teil des spezifischen Erst-Antikörpers binden. Nach einer weiteren Wascheinheit konnte der Substratnachweis

zur Bandendetektion erfolgen. Dafür wurde eine Tablette SIGMAFAST™ BCIP®/NBT (chromogenes Substrat, Anti-Rabbit/Mouse/Rat IgG) pro 10 ml in Aqua dest gelöst und die benötigte Menge auf die Membranen aufgetragen. Das chromogene Substrat 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP) wird hierbei von der alkalischen Phosphatase in Verbindung mit Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) zu einem blau-violetten Farbstoff umgesetzt. Die Farbreaktion ermöglicht den Bandennachweis. Sobald eine Färbung auftrat (nach ca. 7 min), wurden die Membranen in Wasser gespült und zwischen Filterpapieren getrocknet. Durch die Kontrolle der β -Aktin-Banden auf den Membranen (gleiche Intensitäten), konnte der Einsatz gleicher Proteinmengen überprüft werden.

Die Banden der detektierten Enzyme wurden anhand der Proteingröße (kDa) mit Hilfe des Markers auf der Membran auf ihre korrekte Lage überprüft. Die Banden-Intensität gab Aufschluss über die Konzentration des jeweiligen Enzyms innerhalb der Typ-II-Zellen eines Versuchstieres.

3.11 cDNA-Synthese

Bei der cDNA-Synthese wird die aufgereinigte RNA als Matrize für die Synthese eines cDNA-Strangs verwendet, welcher als Produkt aus der Reaktion hervorgeht.

Es wurde mit dem QuantiTect® Reverse Transcription-Kit gearbeitet. Um die Proben von DNA-Kontamination zu befreien, wurde zunächst ein Reaktionsansatz zum DNase-Verdau angesetzt. Anschließend konnte der Reaktionsansatz zur reversen Transkription mit den Substanzen des Kits hergestellt werden.

DNase-Verdau

- DNA-Wipeout-Puffer (Kit) wurde kurz auf 37 °C erwärmt, um Präzipitate zu lösen
- 4 μ l dieses Puffers + 2 μ g RNA einer aufgereinigten RNA Probe wurden mit RNase freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 28 μ l aufgefüllt und vermischt,
- 2 min bei 42 °C im Wasserbad inkubiert und direkt danach auf Eis gelagert

Reaktionsansatz zur reversen Transkription:

- Die entstandenen 28 µl einer Probe wurden mit 8 µl RT-Puffer, 2 µl RT-Primer-Mix und 2 µl Quantiscript-Reverse-Transkriptase zu einem Gesamtvolumen von 40 µl vermischt, bis zur Aufbereitung aller Proben auf Eis gelagert
- Inkubation im Wasserbad bei 42 °C für 15 min
- 3 minütige Inkubation auf dem Heizblock bei 95 °C zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase

Die gebrauchsfertigen cDNA-Proben lagerten bis zur Durchführung der quantitativen Real-Time-Polymerase Kettenreaktion (RT-qPCR) bei -20 °C.

3.12 Quantitative Analyse der Genexpression mittels RT-qPCR

Nach der cDNA-Synthese war die Untersuchung der Proben auf deren Expression bestimmter Gene mittels Real-Time-quantitative-PCR (RT-qPCR) möglich.

Die PCR wurde mit Hilfe eines gebrauchsfertigen Kits und eines Thermocyclers mit dazugehöriger Software der Firma Qiagen durchgeführt.

Die Auswertung erfolgte mittels der „relativen Quantifizierung“, bei der das Ziel-Gen relativ in seiner Expression zu einem zweiten, nicht verwandten Gen bestimmt wird. Für diese Berechnung eignen sich die sogenannten House Keeping Gene (HKGs). Ein solches HKG soll in allen Zellen - unabhängig von vorherigen Stimulationen - die gleiche Expression aufweisen. Hier wurde das ribosomale Protein L32 verwendet. Die Doppelbestimmungen einer Probe müssen eine vergleichbare Expressionen in der HKG-PCR aufwiesen, um mit Ergebnissen anderer Gen-Expressionen selbiger Probe verglichen werden zu können.

Die Quantifizierung der Genexpression der einzelnen Proben wurde durch die Zugabe des fluoreszierenden Farbstoffes SYBR® Green in die Reaktionsmischung ermöglicht, einem Cyanin-Farbstoff, der ein starkes Fluoreszenzsignal bei der Bindung (Interkalierung) an Doppelstrang-DNA aufweist. Dabei nimmt die Fluoreszenz mit der Menge des amplifizierten Produktes während der PCR zu, der Anstieg ist in der exponentiellen Phase der PCR linear. Mit Hilfe der Standards kann die Menge der entstehenden DNA bestimmt werden.

3.12.1 Durchführung der quantitativen Real Time-PCR (RT-qPCR)

Die PCR-Ansätze richteten sich nach den Herstellerangaben des verwendeten Kits. Alle cDNA Proben wurden bei jedem Durchlauf in Doppelbestimmung gemessen. Man bestimmte sowohl die Expression des zu untersuchenden Gens (GR, Gpx3 oder Gpx4, s.Abs.2.2.6) als auch die des HKG L32. Es war sinnvoll die benötigten Mengen (μl) an RNase freiem Wasser, SYBR® Green und jeweiligem Primer entsprechend der Menge der benötigten Tubes vorab zu addieren.

Ansatz pro Tube (9 μl)

4,0 μl RNase freies Wasser

4,5 μl SYBR® Green

0,5 μl Primer insgesamt (0,5 μl bei HKG L 32 der Firma Qiagen bzw. 2 x 0,25 μl der jeweiligen Primerpaare der Firma Eurofins)

Vorgehensweise

9 μl des Ansatzes wurden auf Tubes verteilt,

1 μl der jeweiligen cDNA-Probe hinzugegeben,

negativ Kontrolle: 2 Tubes mit Ansatz, jedoch *ohne* c-DNA

Der Ablauf der PCR sowie die Datenerfassung erfolgten vollautomatisch im Thermocycler. Es wurden 35 Zyklen durchgeführt, dabei betrug die Denaturierungstemperatur 94 °C (40 sec), die Annealingtemperatur 55 °C (40 sec) und die Extensionstemperatur 72 °C (40 sec). Nach Beendigung des Laufs wurde anhand der erhaltenen Fluoreszenzsignale die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen.

3.12.2 Berechnung nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode

Zunächst legte man die Standardgruppen bzw. Kontrollgruppen innerhalb der Testgen- und HKG-Läufe fest, *hier*: PBS/PBS. Die Schmelzkurven der amplifizierten DNA-Stränge eines Gens wurden überprüft. Danach konnten die Threshold Cycle (CT)-Werte berechnet werden. Hierfür musste der Threshold in den Bereich des exponentiellen Fluoreszenz-Anstiegs gelegt werden, um der Kinetik der optimal-effizienten PCR am ehesten zu entsprechen. Die Kurvenverläufe aller Proben sollten auf Höhe des Thresholds linear und möglichst parallel zueinander verlaufen. Fehlerhafte Proben wurden aus den Berechnungen ausgeschlossen.

Die CT-Werte des HKGs der verschiedenen Proben sollten möglichst konstant sein. Traf dies zu, wurden diese Werte des HKGs zur Normalisierung der Zielgen-CT-Werte verwendet. Demnach wurden die ΔCT -Werte wie folgt berechnet:

$$\Delta CT = CT_{Zielgen} - CT_{HKG}$$

Um Abweichungen durch den Reaktionsansatz (z. B. von Primer- oder Polymerase-Konzentrationen) zwischen Zielgenen und *HKG* zu vermeiden, wurde eine interne Kontrolle verwendet, um die ΔCT -Werte für jedes Gen zu normalisieren. Proben der Gruppe PBS/PBS im Vergleich zu allergenbehandelten Tieren nutze man für diese Kontrollen. Die daraus resultierenden $\Delta\Delta CT$ -Werte berechneten sich wie folgt:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{Exponiert} - \Delta CT_{Kontrolle}$$

Da in der optimal-effizienten PCR jeder Amplifikationszyklus einer 2-fachen Zunahme des Produktes entspricht, ergibt sich der relative Expressionsunterschied x bzw. die „x-fold induction“ einer Probe entsprechend der Formel:

$$x - fold\ induction = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Die Herleitung erfolgte nach der Methode von Livac et al. (2001). So konnten unterschiedliche Gen-Expressionen als x-fache Expression mit Hilfe des $\Delta\Delta CT$ -Wertes, normalisiert zum Referenzgen L32 und zum Kontrollgruppenmittelwert (PBS/PBS), berechnet werden. Anschließend war die graphische Darstellung und Auswertung möglich.

3.13 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden mit Hilfe des Statistik Programms GraphPad Prism® ausgewertet. Dabei wählte man Tests, welche die z.T. unterschiedlichen und geringen Tierzahlen innerhalb der Versuchsgruppen berücksichtigten. Zur globalen Varianzanalyse kam der nonparametrische Kruskal-Wallis Test zum Einsatz ($n \geq 3$). Ergab sich hierbei eine signifikante Differenz der Mediane ($p\text{-Wert} \leq 0,05$), konnte der Post-Hoc-Test nach Dunn angeschlossen werden, um alle Gruppen paarweise miteinander zu vergleichen. Signifikant differente Gruppenergebnisse wurden mit *= $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, oder *** = $p \leq 0,001$ gekennzeichnet. Die Abbildungen zeigen die Mittelwerte + SEM (Standard Error of the Mean).

4 Ergebnisse

4.1 Lungenfunktionsmessung an C57BL6- und BALB/c-Tieren

Die Messung der Atemwegshyperreagibilität (AHR) unter Verwendung von Methacholin erfolgte invasiv am einzelnen Tier. Pro Versuchsgruppe wurden 4 bis 5 C57BL6- und 3 BALB/c-Tiere vermessen. Die Berechnung der Ergebnisse ergab in beiden Fällen große Standardabweichungen innerhalb der Versuchsgruppen und keine signifikante Unterschiede der AHR zwischen Versuchs- und Kontrolltieren, weshalb auf eine Abbildung verzichtet wurde.

4.2 Untersuchungen an C57BL6-Tieren

4.2.1 Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit (BAL)

Alle Versuchstiere waren dem Sensibilisierungs- und Provokationschema (Abs. 3.2) unterzogen worden. Einigen Mäusen einer Versuchsgruppe wurde bei der Typ-II-Zell Isolationsoperation die bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit (BAL) entnommen. Die daraus angefertigten Zytospinpräparate konnten nach der Färbung ausgewertet werden. Zudem wurde der Proteingehalt der BAL-Flüssigkeit gemessen (s. Abs. 4.2.1.2).

4.2.1.1 Zytospinpräparate

Man untersuchte Anzahl und Zusammensetzung der in der BAL enthaltenen Zellen. Die Präparate der Versuchstiere wurden auf Anzeichen einer akuten pulmonalen Entzündungsreaktion untersucht. Sowohl eine gesteigerte Gewebsinfiltration mit immunaktiven Zellen, wie den Alveolarmakrophagen, Lymphozyten und Granulozyten, als auch Destruktionen der Gewebsstrukturen kennzeichnen entzündliche Veränderungen. Typisch für die akut-allergische Typ-I-Reaktion ist insbesondere eine hohe Zahl eosinophiler Granulozyten. Entsprechend konnte bei einigen Versuchsgruppen ein absoluter und relativer¹² Anstieg dieser Zellen im Vergleich zu den PBS/PBS-Kontrollen beobachtet werden.

¹² im Vergleich zu Makrophagen, Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten

Die Zytospinpräparate wurden auf ihren Gehalt an Makrophagen, Lymphozyten, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten untersucht. Zur Vergleichbarkeit und Übersicht wurden diese Werte in den Graphiken normiert zum Durchschnittswert der Kontrollen (PBS/PBS) in Prozent angegeben.

Zellzahlen

Die durchschnittliche Zahl lag bei der Kontrollgruppe PBS/PBS bei 116 Zellen, bei der Versuchsgruppe der OVA/OVA behandelten Tiere bei 353 Zellen. Bei den nOVA/nOVA-Tieren wurden 884 Zellen gezählt. Einen vergleichsweise hohen Wert ergab die Auszählung der nKLH/nKLH-Präparate mit durchschnittlich 1626 Zellen. Abbildung 8 dient der Übersicht.

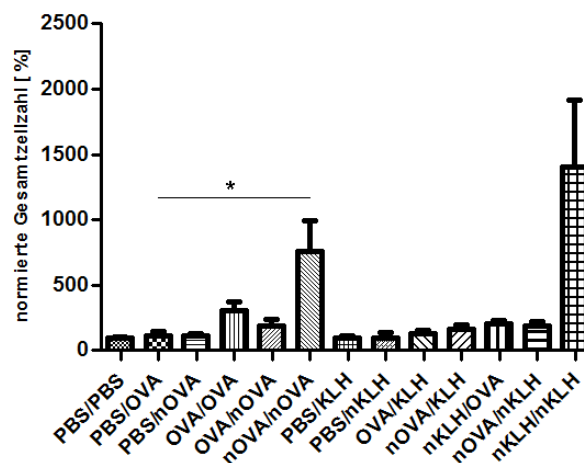


Abbildung 8: Gesamtzellzahlen in Zytospinpräparaten der C57BL6-Versuchsgruppen, normiert zur Kontrollgruppe (PBS/PBS). Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardfehler, n = 3-12, Signifikanzen wurden gekennzeichnet (* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$)

Zellpopulationen

Makrophagen und eosinophilen Granulozyten dominierten die Zellbilder der Zytospinpräparate (Abb. 9). Lymphozyten und neutrophile Granulozyten waren in allen Versuchsgruppen zu einem deutlich geringeren Prozentsatz vertreten (Abb. 10). Der Anteil der Makrophagen lag bei den Zytospinpräparaten der Kontrolltiere (PBS/PBS) bei 98,7 %, vereinzelt fand man Lymphozyten. Bei den Gruppen, die mit PBS sensibilisiert und mit einem Allergen provoziert worden waren¹³, ergab sich eine ähnliche Zellverteilung von durchschnittlich 99 % Makrophagen. Hatte die

¹³ PBS/OVA, PBS/nOVA, PBS/KLH und PBS/nKLH

Sensibilisierung und Provokation mit dem Allergen Ovalbumin oder mit nitriertem Ovalbumin stattgefunden, lag der Anteil eosinophiler Granulozyten dagegen bei durchschnittlich 65 %. Bei der nOVA/nOVA-Gruppe imponierte zudem die mehr als verdoppelte Gesamtzellzahl (Abb. 8).

Die nOVA/KLH-Versuchsgruppen wiesen einen 6 %igen Anteil an eosinophilen Granulozyten auf. Im Vergleich hierzu steigerte sich der Anteil bei den nOVA/nKLH-Gruppen um das 5-fache, auf einen Mittelwert (MW) von 31 %. Bei der nKLH/nKLH-Gruppe konnte eine Erhöhung um ca. das 16-fache (MW = 94 %) ermittelt werden. Lymphozyten und neutrophile Granulozyten waren in den meisten Präparaten nicht oder nur vereinzelt vorzufinden. Etwas häufiger traten sie in Präparaten der Gruppen OVA/OVA, OVA/nOVA, nOVA/nOVA oder nKLH/nKLH auf, jedoch lag ihr Populationsanteil auch hier bei unter 3 %.

Die folgenden Diagramme sind die jeweiligen Versuchsgruppen repräsentiert. Der hohe Gehalt eosinophiler Granulozyten in der BAL zeigen die Säulen der Versuchsgruppe OVA/OVA, nOVA/nOVA und nKLH/nKLH im Vergleich zur Kontrolle.

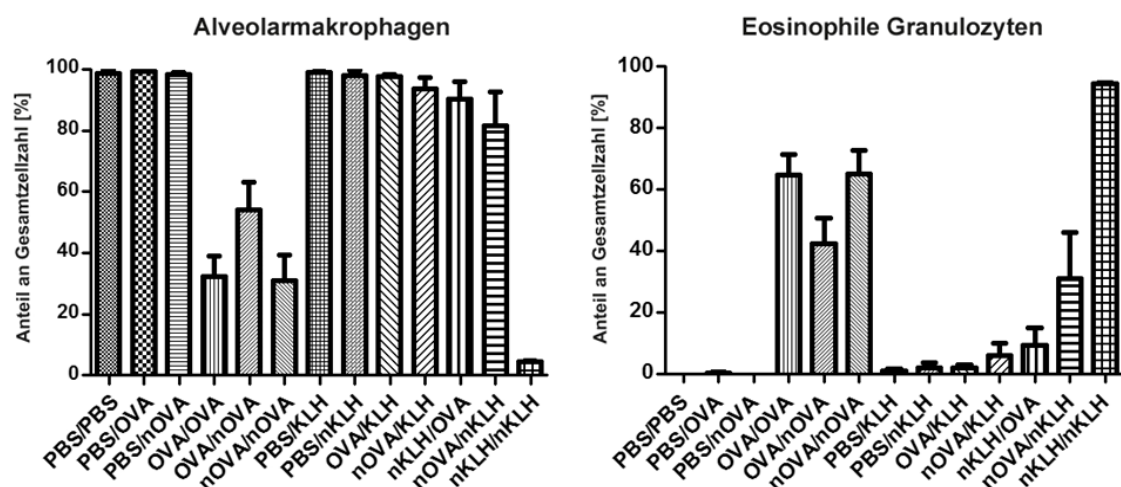


Abbildung 9: Prozentuale Anteile der Makrophagen und eosinophilen Granulozyten in Zytospinpräparaten der C57BL6-Tiere. Li.: Prozentualer Anteil der Makrophagen an der Gesamtzellzahl (BAL), re.: Prozentualer Anteil eosinophiler Granulozyten

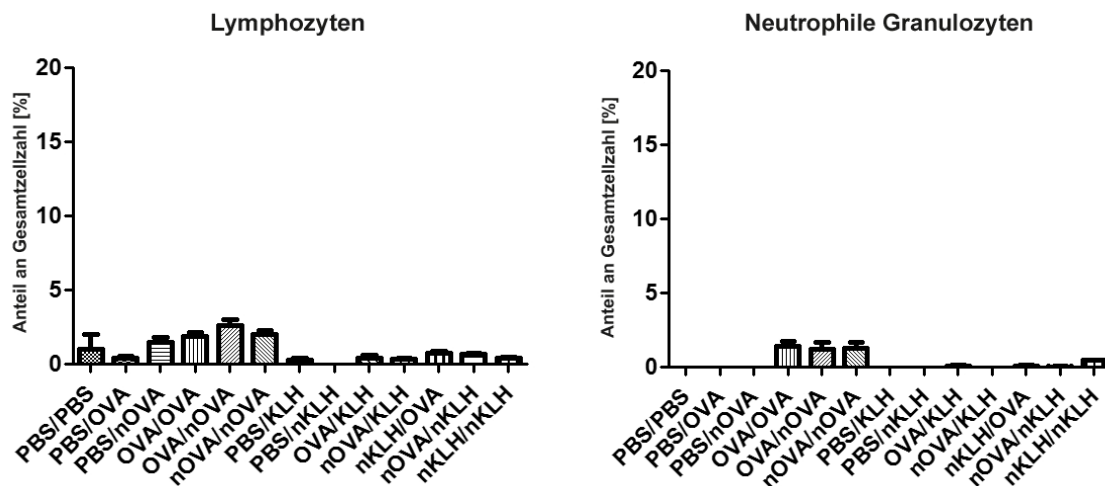
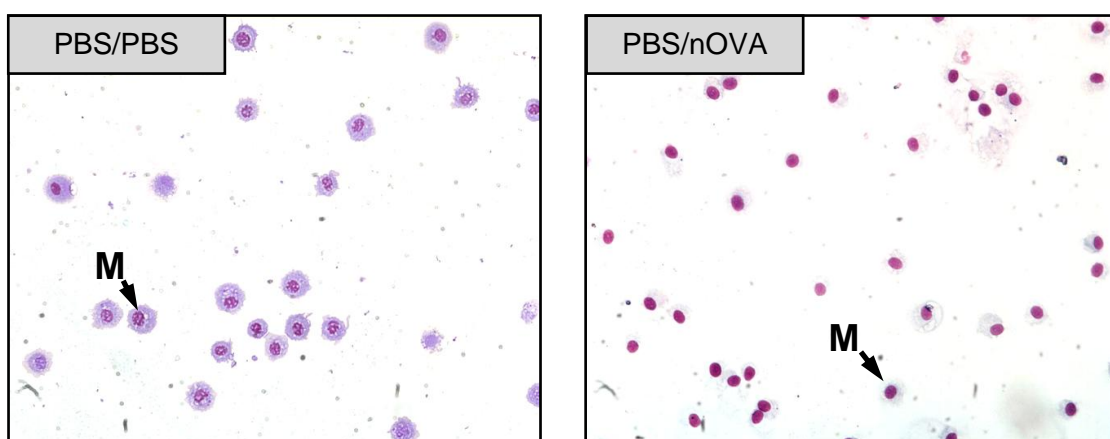


Abbildung 10: Prozentuale Anteile der Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten in Zytospinpräparaten der C57BL/6-Tiere. Li.: Prozentualer Anteil der Lymphozyten an der Gesamtzellzahl (BAL), re.: Prozentualer Anteil neutrophiler Granulozyten

Repräsentative Aufnahmen von Zytospinpräparaten

Mit 3 bis 5 Lavagen verschiedener Tiere pro Versuchsgruppe wurde die Zytospinpräparation durchgeführt.

Die mit Pfeilen versehenen Nummern kennzeichnen verschiedene Zelltypen: Ein **M** kennzeichnet Alveolarmakrophagen, **Eo** eosinophile Granulozyten, **L** Lymphozyten und **Neu** neutrophile Granulozyten.



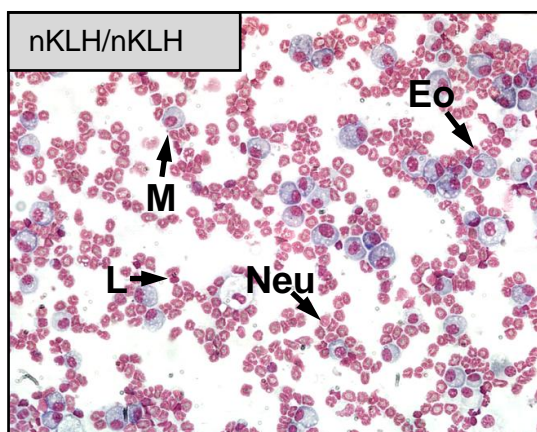
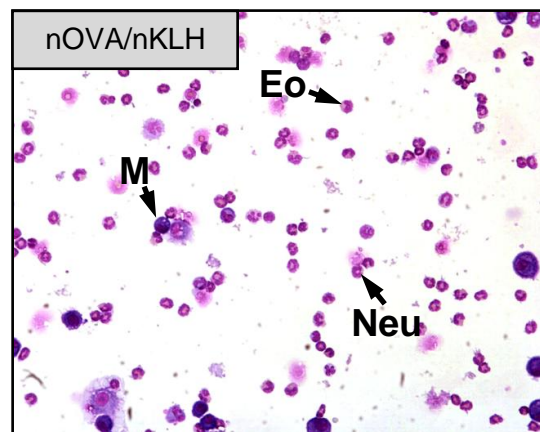
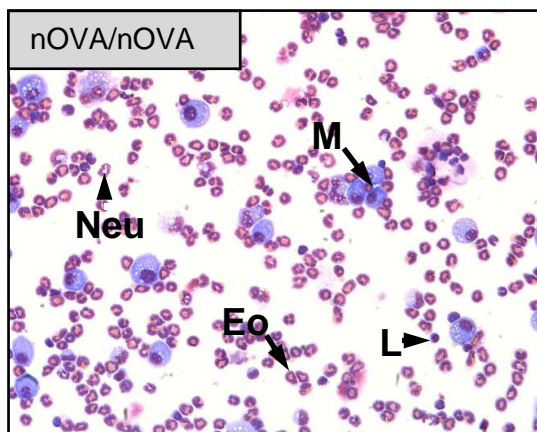
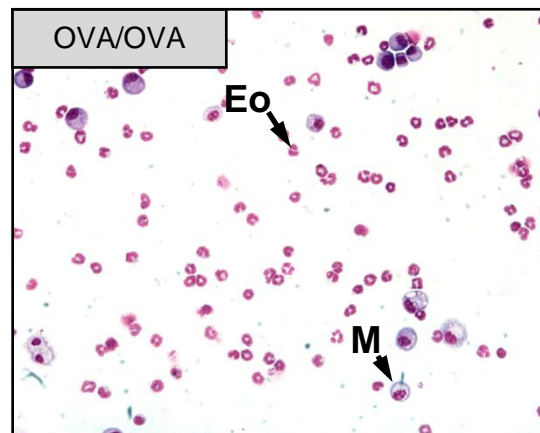
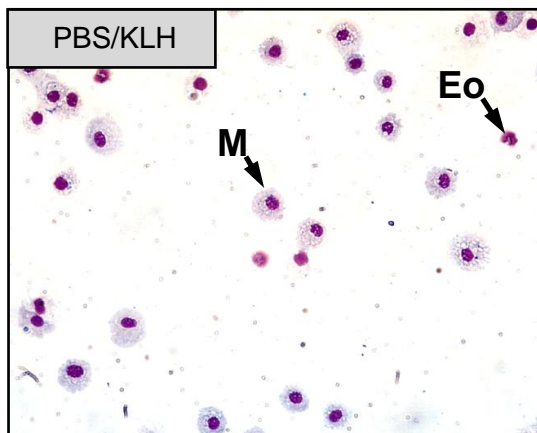


Abbildung 11: Repräsentative Zytospinpräparat-Ansichten (BAL) der C57BL6-Tiere, n = 3-12

- M Makrophagen
- Eo Eosinophile Granulozyten
- L Lymphozyten
- Neu Neutrophile Granulozyten

4.2.1.2 Proteinkonzentration der zellfreien Lavage

Die globale Varianzanalyse der doppelbestimmten Lavagen der C57BL6-Tiere ergab signifikante Unterschiede der Proteinkonzentrationen. Der Proteingehalt der Kontrollgruppen lag bei $140 \mu\text{g/ml} \pm 4,5 \mu\text{g/ml}$. Bei den Versuchsgruppen PBS/OVA und PBS/nOVA ermittelte man eine ca. 35 %ige Steigerung des Gehalts. Eine Verdopplung bis Verdreifachung des Proteingehalts war bei den Gruppen OVA/OVA ($384,3 \mu\text{g/ml} \pm 31,1 \mu\text{g/ml}$), OVA/nOVA ($359,9 \mu\text{g/ml} \pm 58 \mu\text{g/ml}$), nKLH/nKLH ($377,1 \mu\text{g/ml} \pm 11,7 \mu\text{g/ml}$) festzustellen. Der höchste Proteingehalt wurde in der Versuchsgruppe nOVA/nOVA gemessen, er lag bei $439,9 \mu\text{g/ml} \pm 47,4 \mu\text{g/ml}$. Der Vergleich der Mediane der Gruppen nOVA/nOVA und OVA/OVA mit der Kontrollgruppe PBS/PBS ergab einen p-Wert von $<0,01$ und ist somit als signifikant zu betrachten.

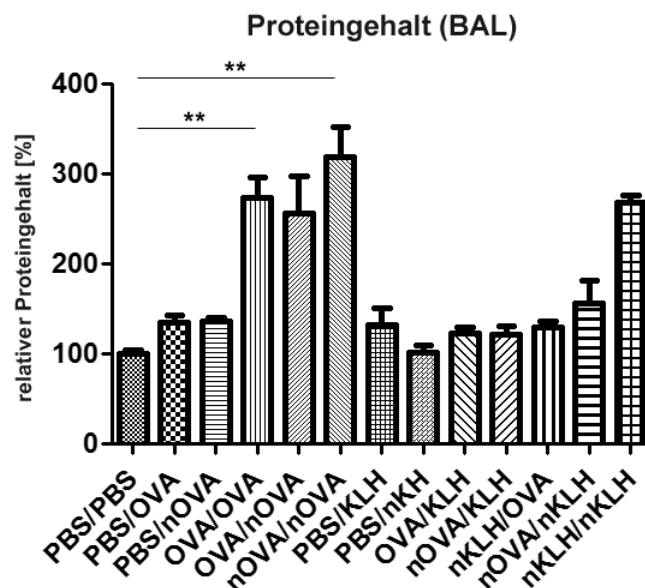


Abbildung 12: Proteingehalt der BAL-Flüssigkeit verschiedener Versuchsgruppen der C57BL6-Tiere, normiert zur Kontrollgruppe (PBS/PBS). Signifikanzen wurden gekennzeichnet (* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$). Es sind die Mittelwerte + Standardabweichung dargestellt, $n = 3-12$

4.2.3 Analyse der Hämatoxylin-Eosin gefärbten Gewebeschnitte

Aus den Lungen einer Versuchsgruppe fertigte man jeweils sechs bis acht histologische Präparate mit $1-2 \mu\text{m}$ Stärke an. Ein Teil dieser Präparate einer Versuchsgruppe wurde zur Strukturanalyse mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Nach den vorgenommenen Sensibilisierungen und Provokationen sollten mögliche reaktive Veränderungen des Lungengewebes festgestellt werden. Die Präparate wurden blind, und unter Benutzung eines Parameter-Score-Systems ausgewertet.

Hierbei wurden für den relativen Grad der Destruktion der Gewebsstruktur, sowie für den relativen Grad der Immunzelleinwanderung (peribronchial und/oder alveolär) ein Zahlenschema¹⁴ angewandt. Als Kontrolle dienten die Präparate PBS/PBS-behandelter Tiere (Abb.13).

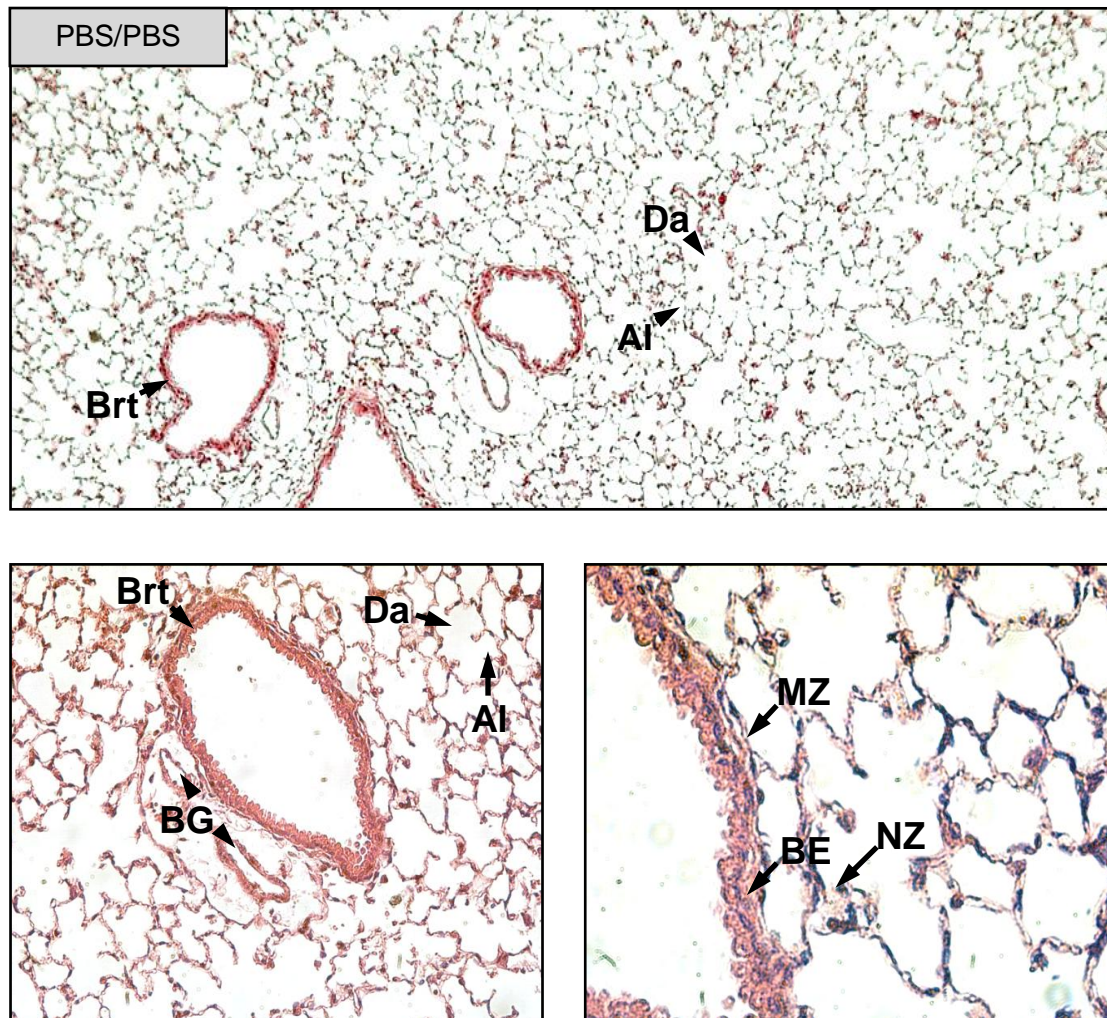


Abbildung 13: Repräsentative Ansichten von histologischen Präparaten PBS/PBS behandelter C57BL6-Tiere, (Vergrößerung o.: 50x, u.li.: 200x, u.re.: 500x)

Brt	Bronchioli terminalis	NZ	Nieschenzelle/ Typ-II-Pneumozyt
Da	Ductus alveolaris	BE	Bronchialepithel der terminalen Brochioli mit Becherzellen (distal eher einreihig-kubisch als mehrschichtig- zylindrisch)
Al	Alveolus		
BG	Blutgefäße: Vasa privata		
MZ	Muskelzellen, "zigarrenförmig"		

¹⁴ von 0 = nicht sichtbar bis 3 = deutlich sichtbar

Der Vergleich der Versuchstierpräparate mit denen der Kontrolltiere ergab deutliche Unterschiede in der Morphologie und Zellinfiltration der Lungen. Abbildung 13 zeigt Aufnahmen der Kontrollen mit beschrifteten Strukturen.

Die Schnitte zeigten ein feines Netz aus Alveolen und Ducti alveolaris, unterbrochen von Anschnitten des Bronchialbaumes und der Gefäße. Zellen mit schaumigem Zytoplasma und großen Zellkerne zeigten das Vorhandensein von Alveolar-makrophagen (Vorläufer sind die mobilen Monozyten mit dunklerem Zellkern) bzw. der epithelialen Typ-II-Pneumozyten an. Beide Zellarten machen typischerweise ca. 10 % der Alveolarzellen aus. Sie sind bei dieser Vergrößerung und Färbung schwer unterscheidbar. Etwa 90 % des Epithels bilden die flachen Typ-I-Pneumozyten. Die Septen bilden Fibrozyten, welche retikuläre und elastische Fasern enthalten und unter anderem das feine Kapillarnetz stützen. Die Wandungen der Alveole, sowie der Kapillare bilden die Blut-Gas-Schranke. Bei Kontrollpräparaten erschien der Großteil des Alveolargewebes transparent, die Septen schmal. Das zylindrische bis kubische Epithel der bronchialen Abschnitte ließ sich gleichmäßig anfärben, die Lumina waren frei. Manche Gefäßanschnitte zeigten die Füllung mit verbliebenen Erythrozyten, umschlossen von flachem Endothel. Die Gefäßwandungen waren schmal und direkt von angrenzendem Alveolargewebe umgeben.

Die Auswertungen der PBS/OVA-, sowie der PBS/nOVA-Präparate ergaben keine oder nur minimale Veränderung der Lungenmorphologie. Eine deutliche perivasale und bronchiale Immunzellinvasion war bei den OVA/OVA-behandelten Tieren zu erkennen. Man sah einen Zellsaum mit zahlreichen dunklen Kernen. Auch das Alveolarepithel war verdichtet, die Septen verbreitert. Die Netzstruktur blieb jedoch erhalten, während diese bei den OVA/nOVA-Präparaten an vielen Stellen zerstört war. Eine Steigerung dieser Beobachtungen stellten die Präparate der nOVA/nOVA-Tiere dar. Die Alveolar-septen waren deutlich verdickt und zellinfiltriert, um die Bronchial- und Gefäßstrukturen bildeten sich breite Zellsäume (Abb.14).

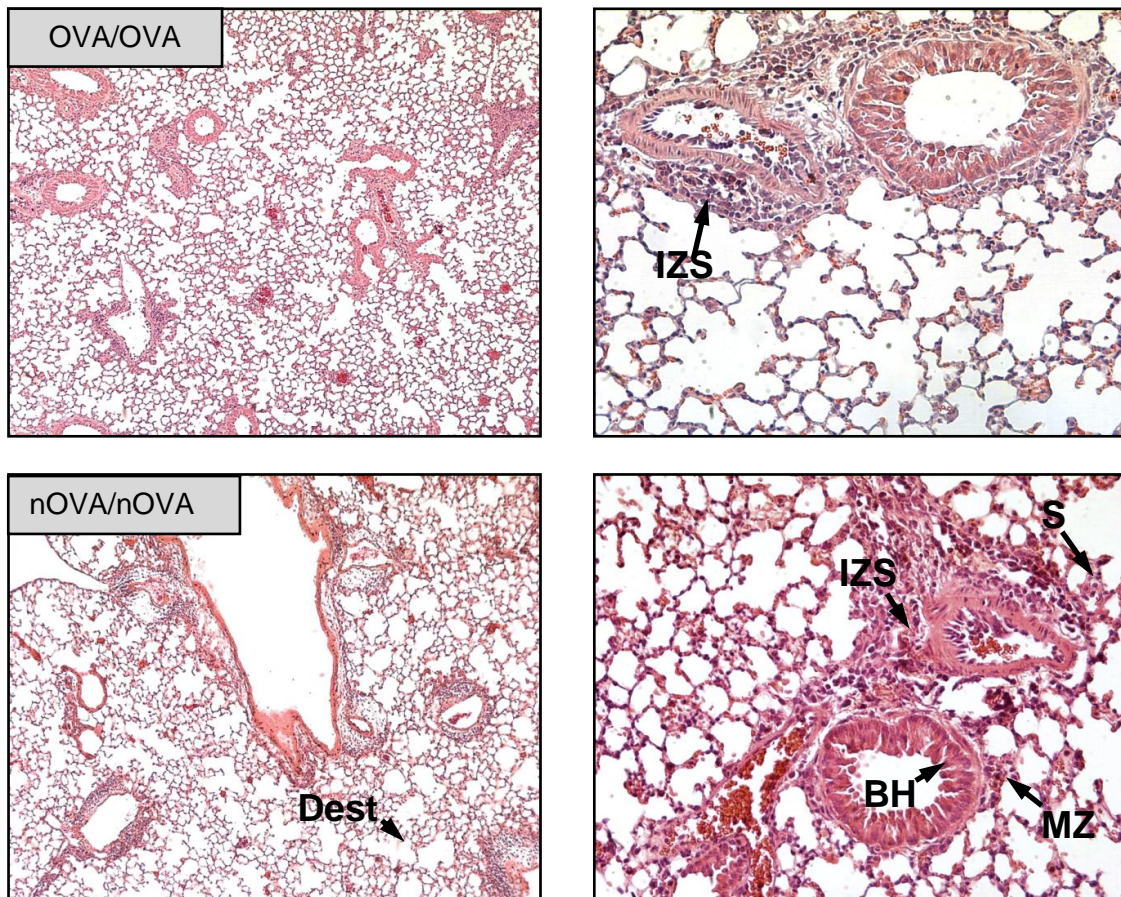


Abbildung 14: Repräsentative Präparatansichten der C57BL6-Versuchsgruppen OVA/OVA und nOVA/nOVA, (Vergrößerung: li. Spalte 50x, re. Spalte 200x).

IZS	Immunzellsaum	BH	Becherzellhyperplasie
S	Septen, hier verdickt	MZ	Muskelzellen
Dest	Destruktion der Alveolarstruktur		

Die PBS/KLH-Präparate unterschieden sich nicht von den Kontrollpräparaten. Eine leichte Verdickung der Septen und eine verstärkte perivasale Zellinfiltration waren bei den OVA/KLH-Präparaten im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten. Sowohl die nKLH/OVA-, als auch die nOVA/KLH-Präparate wiesen darüber hinaus eine höhere Destruktion der alveolären Netzstruktur auf. Der Eindruck verstärkte sich bei Betrachtung der nOVA/nKLH-Präparate. Hier waren die Alveolen an vielen Stellen zerstört, es befanden sich massive Zellinfiltrate insbesondere an den blut- und luftleitenden Strukturen, aber auch im Alveolargewebe.

Ähnliche, im direkten Vergleich zu nOVA/nKLH etwas geringere, entzündliche Veränderungen zeigten die Präparate der nKLH/nKLH-Tiere. Besah man die Ergebnisse aller Versuchsgruppen imponierten diejenigen Gruppen, welche mit nitrierten Substanzen behandelt worden waren, mit einem höheren Grad der Destruktion und Immunzellinfiltration des Lungenparenchyms.

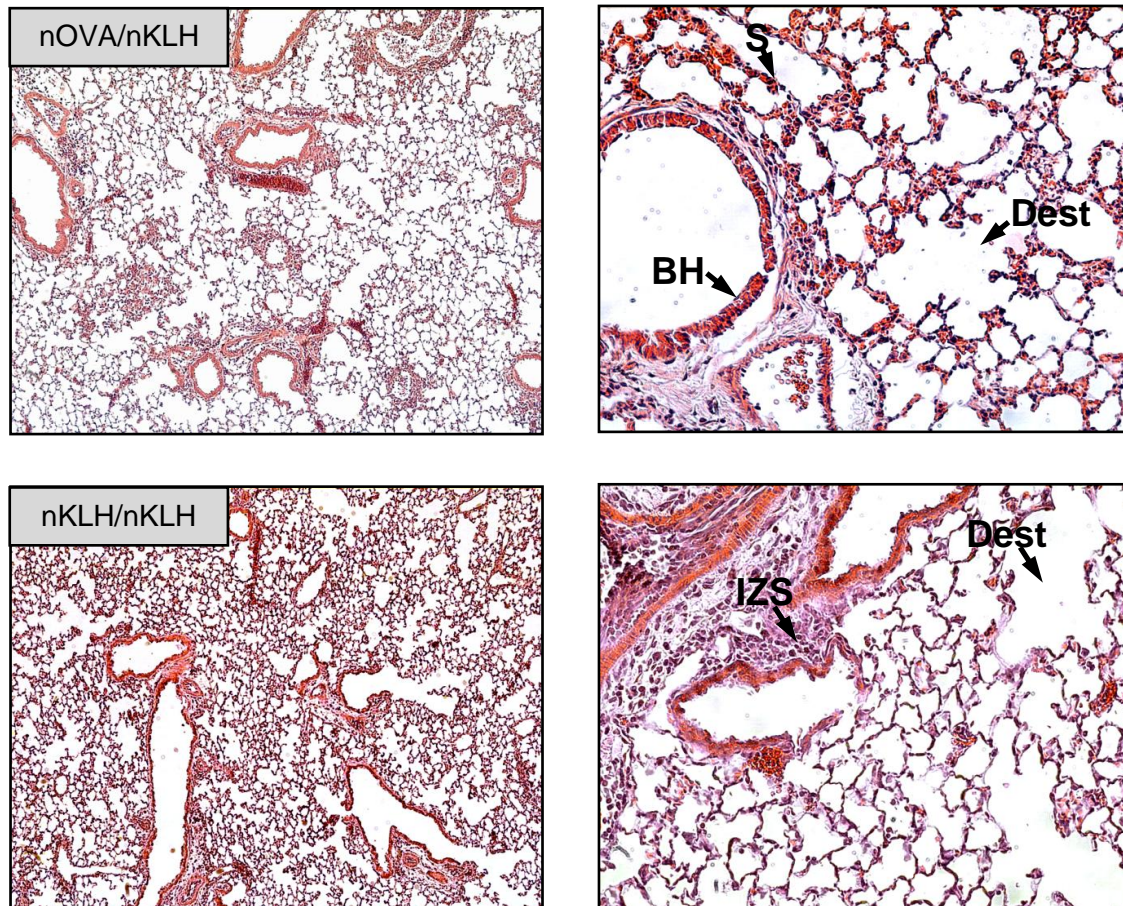


Abbildung 15: Repräsentative Präparatansichten der C57BL6-Versuchsgruppen nOVA/nKLH und nKLH/nKLH, (Vergrößerung: Li. Spalte 50x, re. Spalte 200x)

- S** Septen, hier verdickt
- Dest** Destruktion der Alveolarstruktur
- BH** Becherzellhyperplasie
- IZS** Immunzellsaum

4.2.4 Gesamtproteingehalt der Typ-II-Zellen

Um bei der Gelelektrophorese stets 20 µg Protein einer Probe einsetzen zu können, mussten zunächst die jeweiligen Konzentration (µg/µl) bestimmt werden (s. Methoden Abs. 3.9). Einen Überblick des Proteingehalts der Typ-II-Zellen behandelter Versuchstiere bietet Abbildung 16. Der Gehalt der PBS/PBS-Tiere lag bei 2,6 µg/µl ± 0,5 µg/µl, bei den OVA/OVA-Tieren bei 2,1 µg/µl ± 0,5 µg/µl. Bei der nOVA/nOVA-Gruppe maß man 3,1 µg/µl ± 0,7 µg/µl und bei der nKLH/nKLH-Gruppe 3,6 µg/µl ± 0,3 µg/µl.

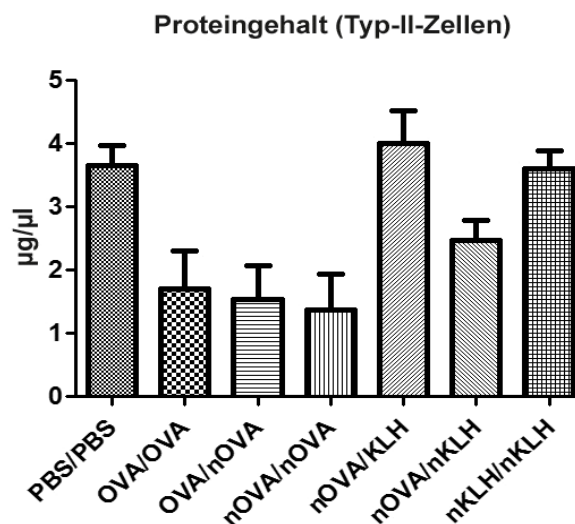


Abbildung 16: Typ-II-Zell-Proteingehalt (µg/µl) der C57BL6-Tiere, n = 3. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardfehler.

4.2.5 Detektion antioxidativer Enzyme

Nach der HE-Übersichtsfärbung wurde der verbliebene Teil der histologischen Präparate einer Versuchsgruppe immunhistologischen Färbungen unterzogen. Hierbei konnten die Präparate auf den Gehalt von Glutathionreduktase (GR), Glutathionperoxidase 3 und 4 (GPX3 und GPX4), Enzymen des antioxidativen Systems, untersucht werden. Die Kontrollen sind in Abbildung 17 dargestellt.

Mit den gewonnenen Typ-II-Zell-Proteinen führte man zudem Westernblots zur Detektion von Glutathionreduktase und Glutathionperoxidase 3 durch. Beide Ansätze (Immunhistologie und Western Blot) ermöglichten den Enzymnachweis auf Zell-Ebene. Die Intensität der Banden zeigt einen hohen bzw. niedrigen Gehalt des jeweiligen Enzyms innerhalb der jeweiligen Probe an. Zur Ladekontrolle dienten β-Aktin-Banden.

Mit einigen Tieren ausgewählter Versuchsgruppen folgte die Analyse der gewonnenen cDNA mittels RT-qPCR. Nach der Detektion von Glutathionreduktase, Glutathionperoxidase 3 und Glutathionperoxidase 4 auf posttranslationaler Ebene, war die Genexpression dieser antioxidativen Enzyme von Interesse. Sie wurde anhand der Quantifizierung der bei jedem Zyklus entstehenden Ziel-DNA gemessen (s. Abs. 3.12).

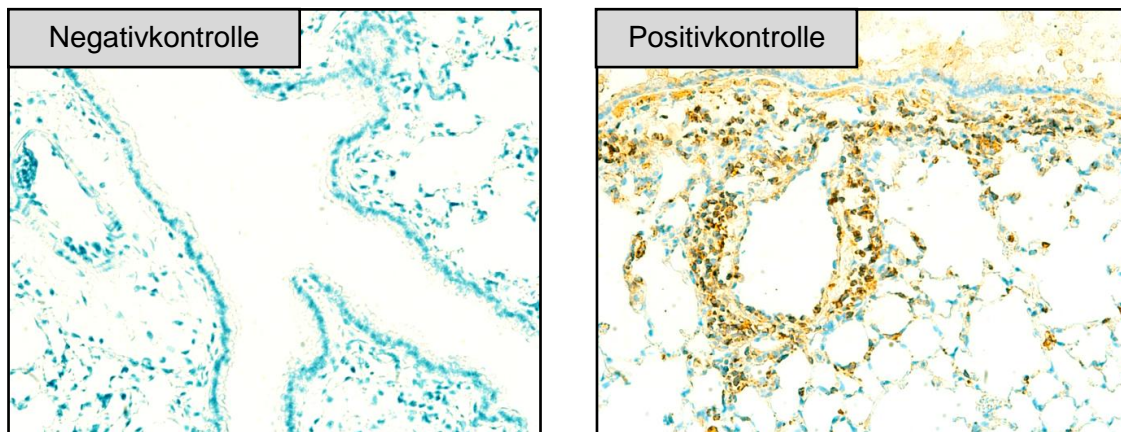


Abbildung 17: Li.: Negativkontrolle (PBS), re.: Positivkontrolle (β-Aktin) für die immunhistologische Färbung bei C57BL6-Tieren, Vergrößerung: 200x

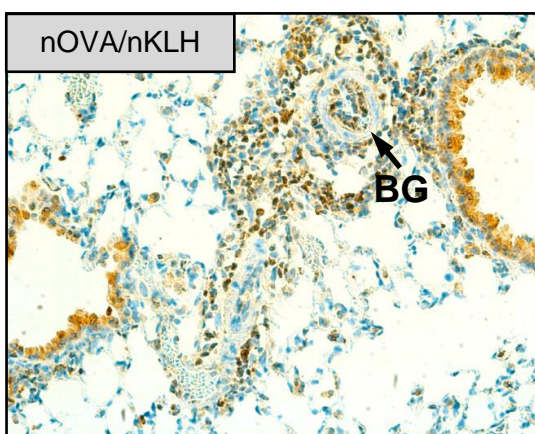
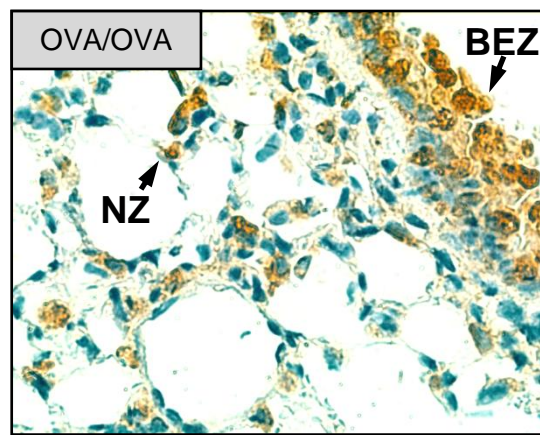
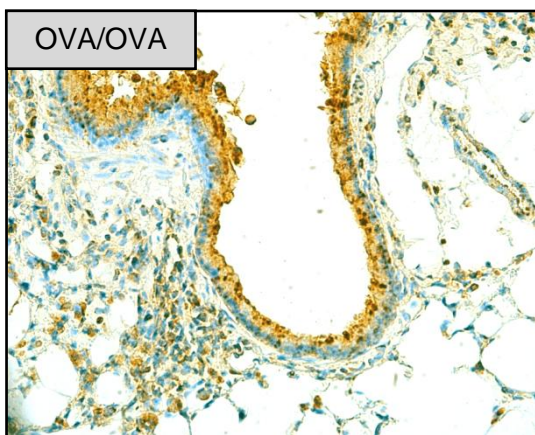
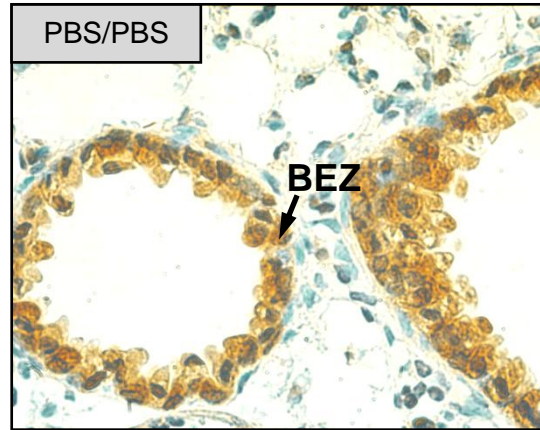
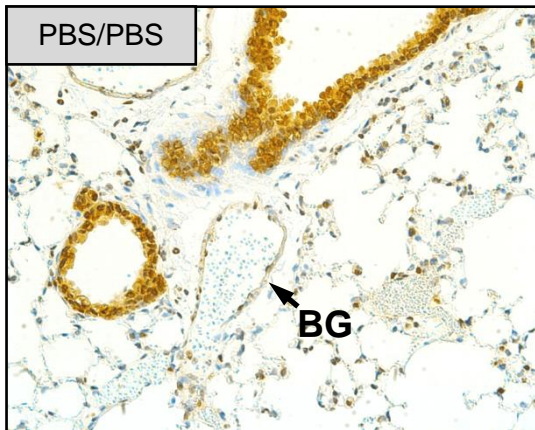
4.2.5.1 Detektionen auf Glutathionreduktase (GR)

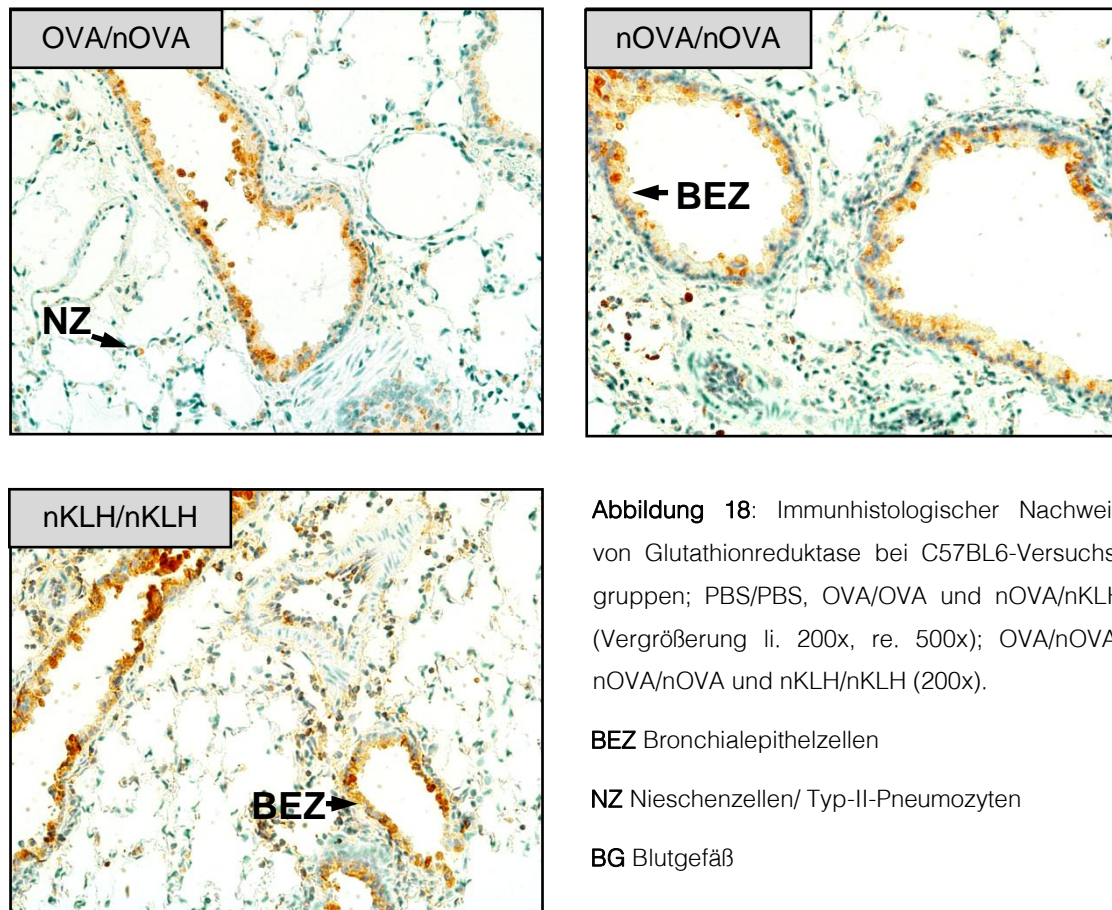
4.2.5.1.1 Immunhistologische Detektion der GR

Im Gegensatz zur negativ Kontrolle (Abb.17) wiesen alle Versuchsgruppen nach der Detektion mittels Anti-Glutathionreduktase-Antikörper eine erkennbare Nachweisreaktion auf: Bei den PBS/PBS Versuchstieren zeigten sich in den Bronchialepithelzellen deutlich rötliche bis bernsteinfarbene Einschlüsse (Abb.18). Im Alveolarbereich traten vereinzelt Färbungen auf, welche einen GR-Gehalt der Typ-II-Pneumozyten anzeigten. Ein ähnliches Bild bot die Auswertung der OVA/OVA-Präparate und der nOVA/nKLH-Präparate.

Im Vergleich etwas schwächere, aber dennoch deutliche Färbungen wurden bei den nOVA/KLH-, nOVA/nOVA- und nKLH/nKLH- Versuchsgruppen festgestellt.

In den Abbildungen kennzeichnen die Abkürzungen **BEZ** Bronchialepithelzellen, **NZ** Nieschenzellen/ Typ-II-Pneumozyten und **BG** ein Blutgefäß.





4.2.5.1.2 Enzymnachweis der GR mittels Western Blot

Der Nachweis von Glutathionreduktase mittels Westernblot fiel trotz mehrmaliger Wiederholung qualitativ mäßig aus. Durch die Blässe der Detektionsfärbung zeigten die Proben einander ähnliche, leicht verschwommene Banden. Im korrekten Markerbereich von 58 kDa konnte jedoch bei allen Gruppen eine Bandenbildung beobachtet werden.

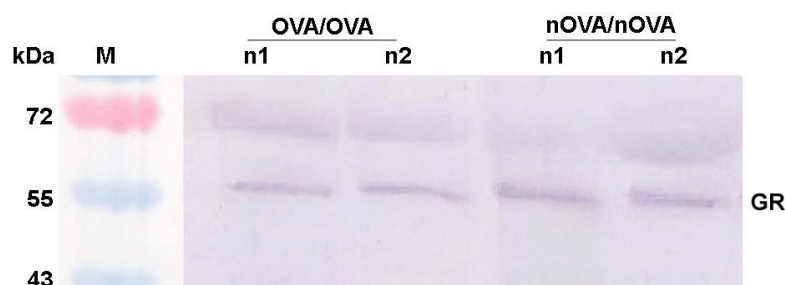


Abbildung 19: Nachweis der GR mittels Western Blot unter Verwendung von Typ-II-Zell-Proteinproben der C57BL6-Tiere, M = Marker, n = 3-4 pro Versuchsgruppe, es fanden wiederholte Messungen statt.

4.2.5.1.3 Genexpression der GR

Während bei der Immunhistologie ein deutlicher Nachweis der Glutathionreduktase bei verschiedenen Gruppen (einschließlich der PBS/PBS Kontrollgruppen) gelang, fielen die Expressions-Ergebnisse insbesondere für die OVA/OVA- ($40 \% \pm 6,2 \%$), nOVA/nOVA- ($26 \% \pm 2,7 \%$) und die nOVA/nKLH- ($45,8 \% \pm 2,1 \%$) Gruppe gegenläufig aus. Im Vergleich zu den Kontrollgruppen PBS/PBS ($98 \% \pm 11 \%$) wurde hier eine deutlich geringere Expression gemessen. Der Wert der nKLH/nKLH-Gruppe näherte sich mit $87,9 \% \pm 6,5 \%$ dem der Kontrolle an. Sehr niedrig fielen die Messwerte der OVA/nOVA- ($18,7 \% \pm 1,9 \%$), sowie der nOVA/KLH-Gruppe ($17,3 \% \pm 1,4 \%$) aus.

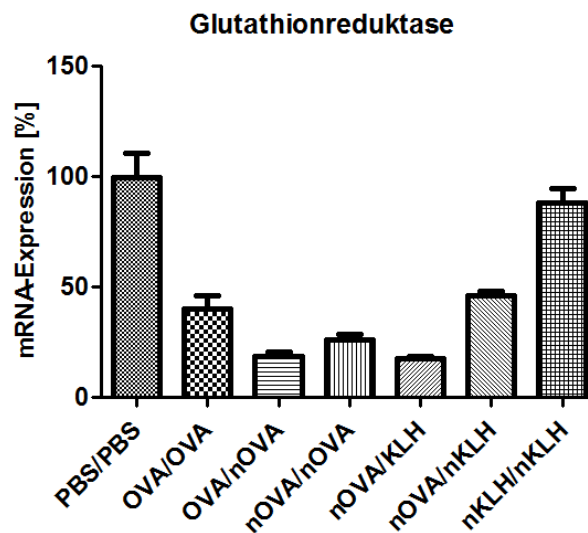


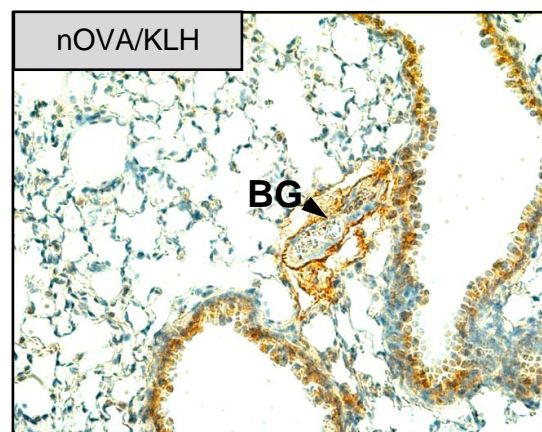
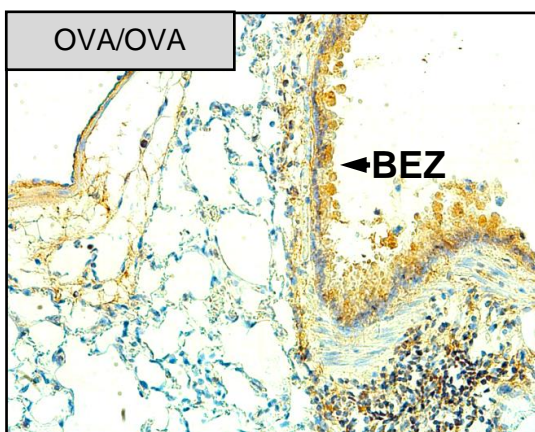
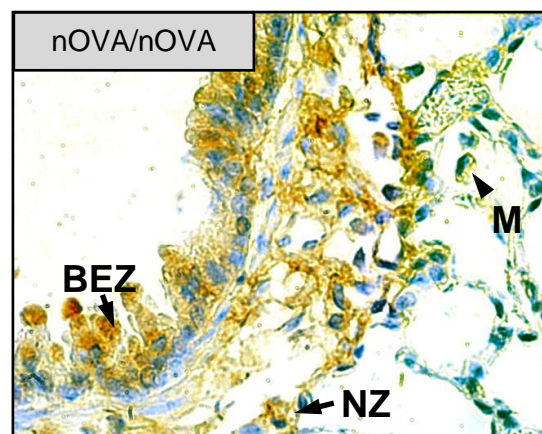
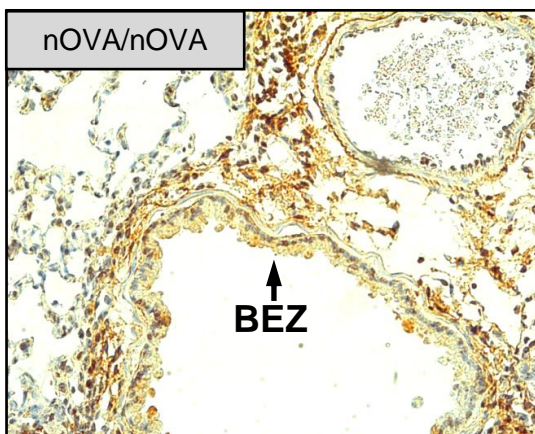
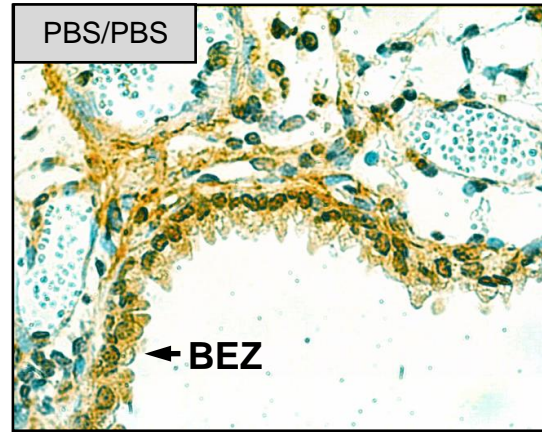
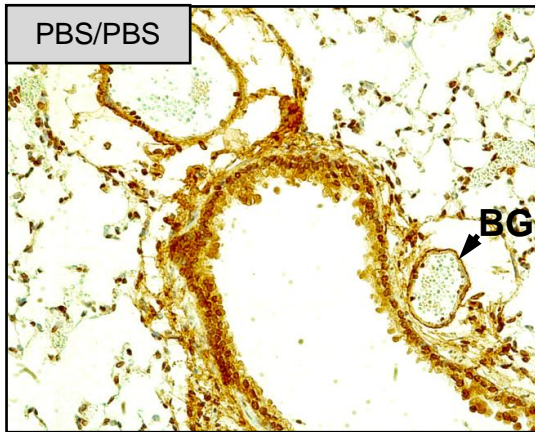
Abbildung 20: m-RNA-Expression der Glutathionreduktase verschiedener C57BL6-Versuchsgruppen, normiert zur Kontrollgruppe (PBS/PBS), $n = 3$. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardfehler.

4.2.5.2 Detektionen auf Glutathionperoxidase 3 (GPX3)

4.2.5.2.1 Immunhistologische Detektion der GPX3

Bei verschiedenen Gruppen konnte GPX3, vor allem im bronchoepithelialen Bereich, detektiert werden. Zwischen den Versuchsgruppen waren die Intensitätsdifferenzen der Nachweisreaktion gering. Die Ergebnisse der PBS/PBS-Präparate ähnelten denen der nOVA/nOVA- und nKLH/nKLH-Tiere. Bei der nOVA/nKLH-Versuchsgruppe beobachtete man eine vergleichsweise intensivere Färbung.

In den folgenden Abbildungen kennzeichnen die Abkürzungen **BG** Blutgefäße, **BEZ** Bronchialepithelzellen, **M** Makrophagen und **NZ** Nieschenzellen/Typ-II-Pneumozyten.



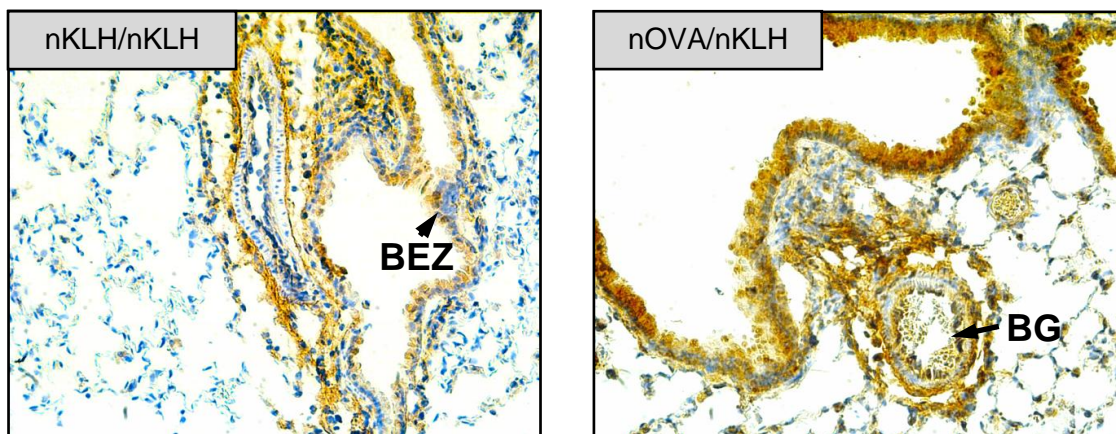


Abbildung 21: Immunhistologischer Nachweis von Glutathionperoxidase 3 bei C57BL6-Versuchstieren, PBS/PBS (Vergrößerung li. 200, re. 500x), nOVA/nOVA (li. 200x, re. 500x), OVA/OVA, nOVA/KLH nKLH/nKLH, nOVA/nKLH (200x)

BG Blutgefäße

M Makrophage

BEZ Bronchialepithelzellen

NZ Nieschenzelle/Typ-II-Pneumozyt

4.2.5.2.2 Enzymnachweis der GPX3 mittels Westernblot

Die Auswertung der Westernblots ergab für GPX3 differenzierte Ergebnisse. Die Bandenintensität nahm von PBS/PBS über OVA/OVA zu nOVA/nOVA leicht zu (Abb. 22). Der Vergleich der GPX3-Banden der nOVA/KLH- und nKLH/nKLH-Gruppe mit denen der nOVA/nKLH-Gruppe bestätigte das Ergebnis der Immunhistologie: Die Banden der nOVA/nKLH-Tiere waren intensiver ausgeprägt (Abb. 23). Bei Mäusen des C57BL6-Stammes ließ sich der größere (molekulare Größe) Anteil der Glutathionperoxidase 3 kräftiger detektieren, die Bande lag auf der Höhe von ca. 42 kDa. Die Bande des molekular kleineren Anteils des Enzyms liegt bei 24 kDa und war schwächer sichtbar.

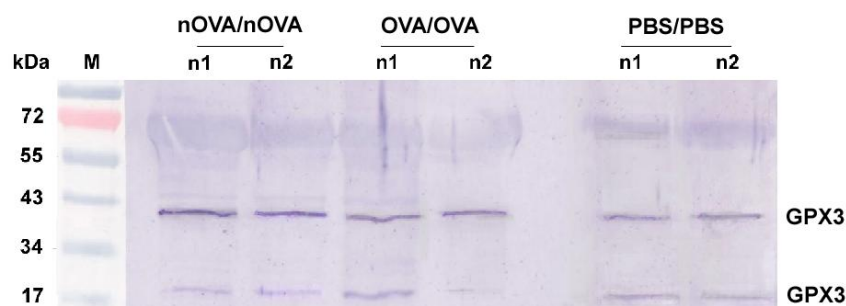


Abbildung 22: Nachweis von GPX3 durch Western Blot unter Verwendung von Typ-II-Zell-Proteinproben der C57BL6-Tiere. M = Marker, n = 3-4 pro Versuchsgruppe, es fanden wiederholte Messungen statt.

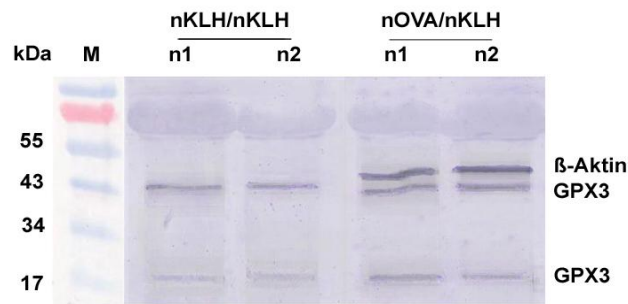


Abbildung 23: Nachweis von GPX3 durch Western Blot unter Verwendung von Typ-II-Zell-Proteinproben der C57BL6-Tiere. M = Marker, n = 3-4 pro Versuchsgruppe, es fanden wiederholte Messungen statt. β-Aktinbande zur Landkontrolle.

4.2.5.2.3 Genexpression der GPX3

Auch bei der Messung der Glutathionperoxidase 3 auf mRNA-Ebene erzielte keine Versuchsgruppe höhere Werte als die Kontrollgruppe PBS/PBS ($100 \% \pm 0,7 \%$). Wie aus Abbildung 24 hervorgeht, waren die Messwerte der Versuchsgruppen OVA/OVA, nOVA/KLH, nOVA/nKLH und nKLH/nKLH auf ca. 50 % des Kontrollgruppen-Durchschnitts reduziert, bei niedrigen Standardfehlern von ca. $\pm 2 \%$. Eine geringere Expression war bei der OVA/nOVA- ($14,8 \% \pm 0,5 \%$) und nOVA/nOVA-Gruppe ($26,6 \% \pm 4,5 \%$) festzustellen.

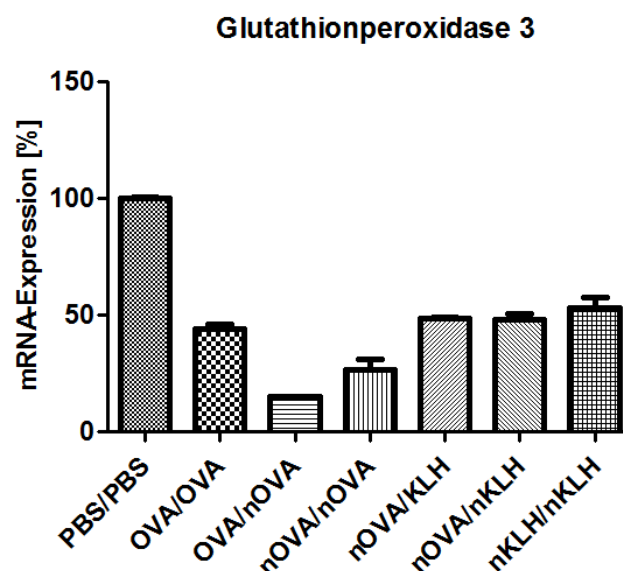


Abbildung 24: m-RNA-Expression der Glutathionperoxidase 3 verschiedener C57BL6-Versuchsgruppen, normiert zur Kontrollgruppe (PBS/PBS). Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardfehler, n = 3

4.2.5.3 Detektion auf Glutathionperoxidase 4 (GPX4)

4.2.5.3.1 Immunhistologische Detektion der GPX4

Die Glutathionperoxidase 4 ließ sich in den Präparaten der Versuchsgruppen kaum nachweisen. Nach der Antikörperinkubation und Färbung ähnelten die Ergebnisse dem kontrollbehandelten Präparat. Sehr schwache Reaktionen wurden bei den PBS/PBS-Gruppen beobachtet.

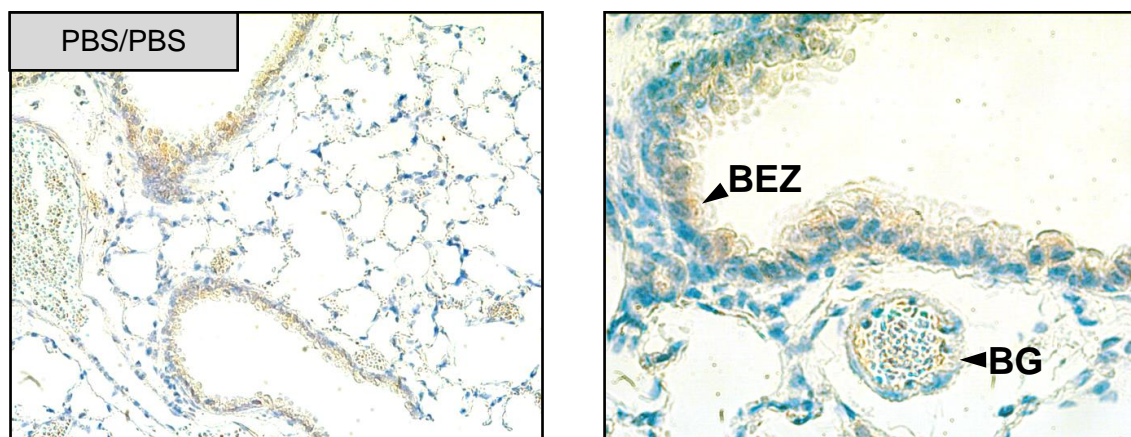


Abbildung 25: Immunhistologischer Nachweis von Glutathionperoxidase 4 bei C57BL6-Tieren, Vergrößerung li.: 200x, re.: 500x

BEZ Bronchialepithelzelle

BG Blutgefäß

4.2.5.3.2 Genexpression der GPX4

Die immunhistologisch gefärbten Präparate der Kontroll- und Versuchsgruppe unterschieden sich in ihrem Ergebnis kaum von den mit PBS benetzten Präparaten, welche als Negativkontrolle dienten.

Bei der Berechnung der GPX4-Genexpression trat hingegen zwischen Kontroll- und Versuchsgruppen eine Diskrepanz auf: Die Expressionswerte der Versuchsgruppen fielen deutlich geringer aus.

Die PBS/PBS-Werte lagen entsprechen der Normierung bei $100 \% \pm 19 \%$. Deutlich geringere Werte ergaben die relativen Expressionen der OVA/OVA- ($27,2 \% \pm 3,6 \%$), nOVA/nOVA- ($25,1 \% \pm 3,4 \%$) und der nKLH/nKLH- ($30,8 \% \pm 3,8 \%$) Gruppe. Bei den Gruppe OVA/nOVA ($17,8 \% \pm 6,6 \%$), nOVA/KLH ($3,5 \% \pm 1,2 \%$) und nOVA/nKLH ($14,8 \% \pm 4,3 \%$) zeigten sich die Expressionen im Vergleich zum mittleren Kontrollwert zu über 80 % reduziert.

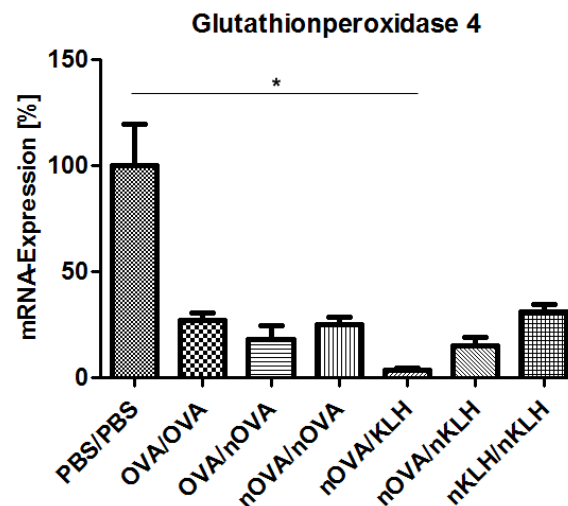


Abbildung 26: m-RNA-Expression der Glutathionperoxidase 4 verschiedener C57BL6-Versuchsgruppen normiert zur Kontrollgruppe (PBS/PBS), $n = 3$. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardfehler, Signifikanzen wurden gekennzeichnet (* = $p \leq 0,05$)

4.3 Versuche an BALB/c-Tieren

Bei den Versuchskombinationen mit BALB/c-Tieren wurden diese, neben den Allergenen Ovalbumin (OVA) und Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH), zusätzlich mit nitriertem Polytyrosin (nPT) behandelt. Die pulmonalen Reaktionen der Tiere auf die Behandlung mit dieser Substanz unterschieden sich teilweise auffällig von den Reaktionen auf die Allergenbehandlung. In den Diagrammen sind diejenigen Kombinationen, welche nitriertes Polytyrosin als Versuchssubstanz enthielten, durch blaue Balken repräsentiert.

4.3.1 Zytospinpräparate der bronchoalveolären Lavage

Zellzahlen

Bei den BALB/c-Tieren lag die Zellzahl der Kontrollgruppe PBS/PBS im Mittel bei 100 Zellen. Die OVA/OVA-Präparate enthielten durchschnittlich 355 Zellen, während die nOVA/nOVA-Präparate 2250 Zellen erzielten, dies entspricht einer über 22-fachen Zunahme der Zelldichte im Vergleich zur Kontrolle. Eine annähernd hohe Zelldichte ergab die Auszählung der nKLH/nKLH-Präparate mit 1413 Zellen im Durchschnitt - die 14-fachen Zellmenge der Kontrollen.

Im Vergleich zur nOVA/nKLH-Gruppe fiel die mittlere Zellzahl der nKLH/nOVA-Gruppe höher aus (Mittelwerte: nOVA/nKLH-Gruppe 209 Zellen, nKLH/nOVA-Gruppe 538 Zellen). Präparate der nOVA-Tiere enthielten, auch in der Kombination mit nitriertem Polytyrosin, einen höheren durchschnittlichen Zahlenwert (MW: nPT/nKLH-Gruppe: 119 Zellen, MW: nPT/nOVA-Gruppe: 323 Zellen). Der MW der nPT/nPT-Präparate lag bei 482 Zellen, also dem 5,4-fachen Wert der Kontrollgruppen.

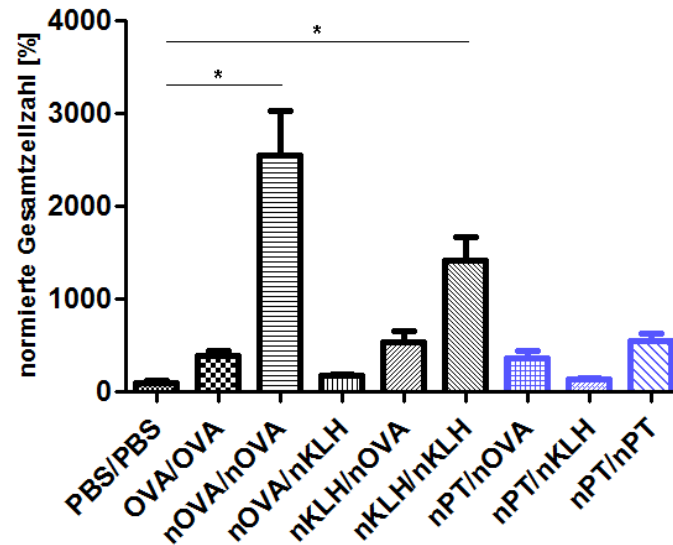


Abbildung 27: Gesamtzellzahlen in Zytospinpräparaten der BALB/c-Versuchsgruppen, normiert zur Kontrollgruppe (PBS/PBS). Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardfehler, $n = 3-12$, Signifikanzen wurden gekennzeichnet (* = $p \leq 0,05$)

Zellpopulation

Die vereinzelt Zellen der Kontrollpräparate (PBS/PBS) waren zu ungefähr 99 % Makrophagen. Bei den Gruppen nOVA/nKLH und nKLH/nOVA lag ihr Anteil bei über 80 %, allerdings fand man bei den nKLH/nOVA-Gruppen die 3-fache Zelldichte der nOVA/nKLH-Gruppe vor.

Der Makrophagen-Anteil der Versuchsgruppe nKLH/nKLH lag unter einem Fünftel, zu 70 % bestand das Zellbild aus eosinophilen Granulozyten bei hoher Zelldichte. Die Gruppen OVA/OVA und nOVA/nOVA zeigten vergleichbare Populationsanteile der Makrophagen (10-15 %) und eosinophilen Granulozyten (70-80 %), wobei die wesentlich höhere Gesamtzellzahl der nOVA/nOVA-Gruppe beachtet wurde.

Neutrophile Granulozyten sah man vereinzelt bei den Gruppen OVA/OVA, nOVA/nOVA und nKLH/nKLH, ihr Anteil lag bei ca. 6 %. Die Quote der Lymphozyten lag bei den genannten Versuchsgruppen bei ca. 10 %, bei der Gruppe nPT/nPT bei 5 %. Ebenso gering waren die eosinophilen Granulozyten in den Gruppen nPT/nKLH, nPT/nOVA und nPT/nPT vertreten. Trotz ansteigender Immunzelldichte blieb das Populationsverhältnis ähnlich, zu über 90 % wurden Makrophagen ausgezählt.

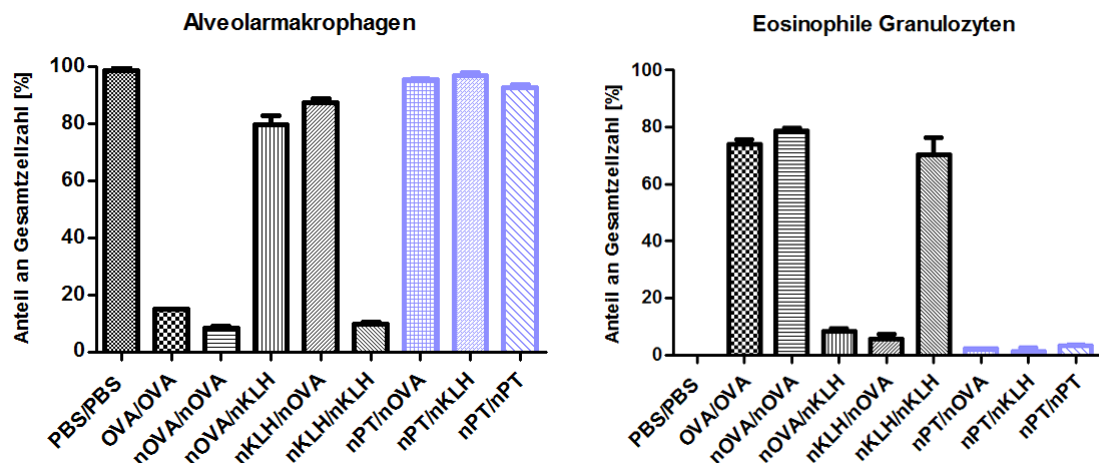
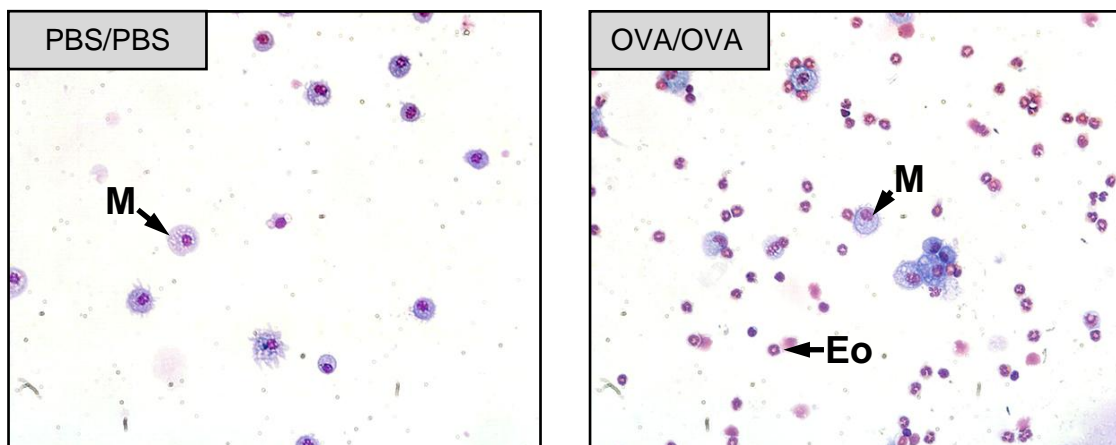


Abbildung 28: Prozentuale Anteile der Makrophagen und eosinophilen Granulozyten in Zytospinpräparaten der BALB/c-Tiere. Li.: Prozentualer Anteil der Makrophagen an der Gesamtzellzahl (BAL), re.: prozentualer Anteil der eosinophilen Granulozyten, n = 3. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardfehler.

Repräsentative Aufnahmen von Zytospinpräparaten

Die mit Pfeilen versehenen Abkürzungen kennzeichnen verschiedene Zelltypen: Das **M** kennzeichnet Alveolarmakrophagen, **Eo** eosinophile Granulozyten, ein **L** Lymphozyten und **Neu** neutrophile Granulozyten.



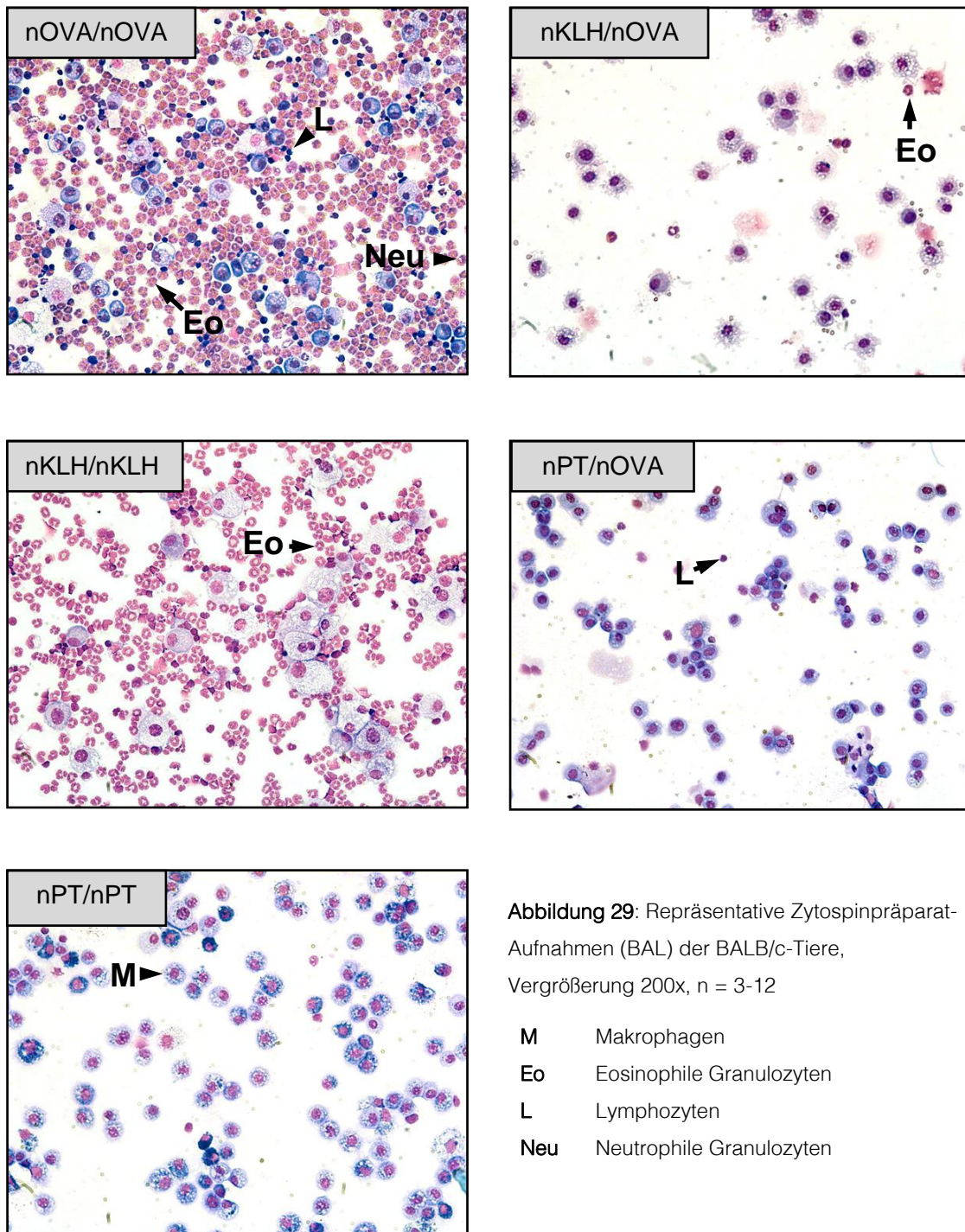


Abbildung 29: Repräsentative Zytospinpräparat-Aufnahmen (BAL) der BALB/c-Tiere, Vergrößerung 200x, n = 3-12

- M** Makrophagen
- Eo** Eosinophile Granulozyten
- L** Lymphozyten
- Neu** Neutrophile Granulozyten

4.3.2 Proteinkonzentration der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit

Vergleichs- gruppen	Proteingehalt BALF ($\mu\text{g/ml}$)
PBS/PBS	$67,7 \pm 8,9$
OVA/OVA	$208,7 \pm 13,3$
nOVA/nOVA	$491,6 \pm 6,9$
nOVA/nKLH	$195,8 \pm 16,9$
nKLH/nOVA	$212,3 \pm 18,4$
nKLH/nKLH	$357,4 \pm 13,2$
nPT/nOVA	$156,7 \pm 17,6$
nPT/nKLH	$150,8 \pm 14,5$
nPT/nPT	$151,9 \pm 13,4$

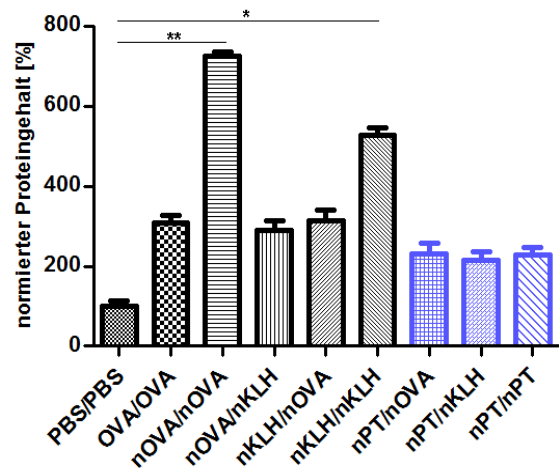
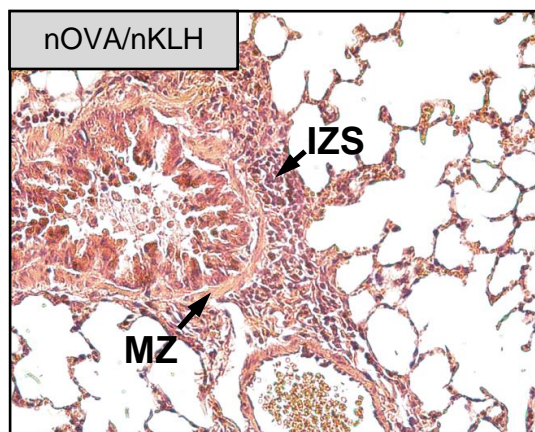
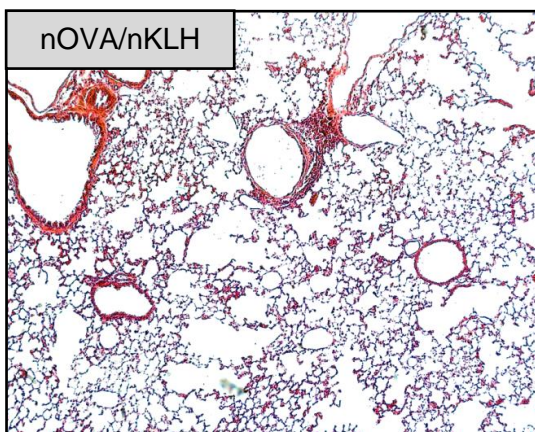
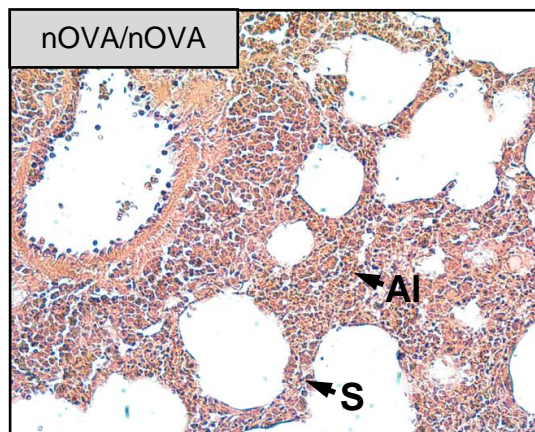
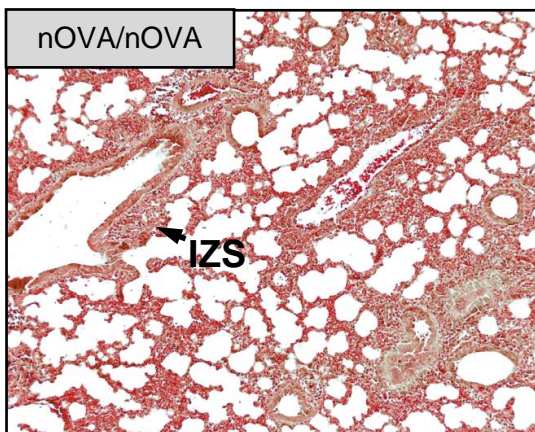
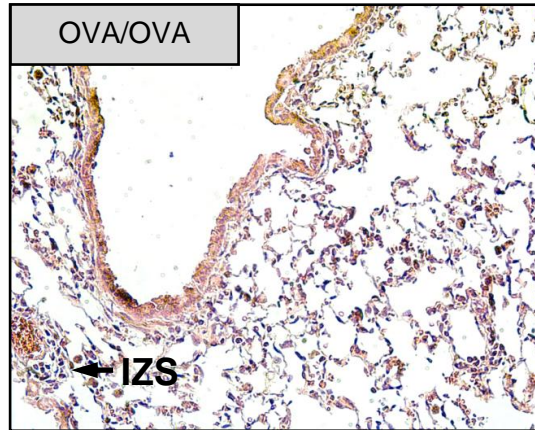
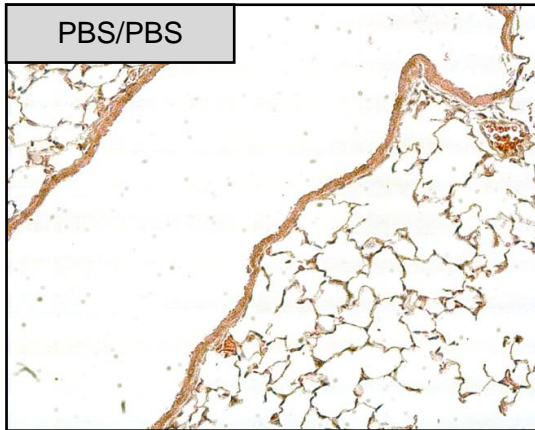


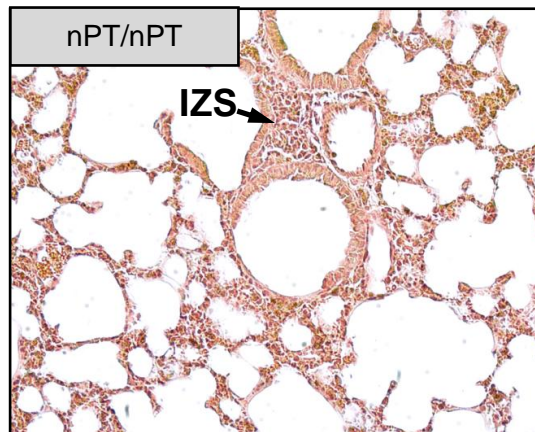
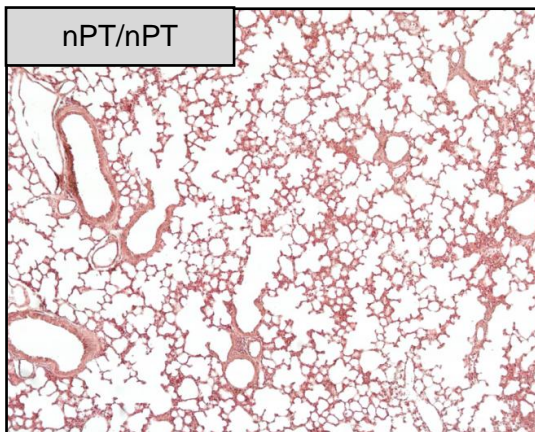
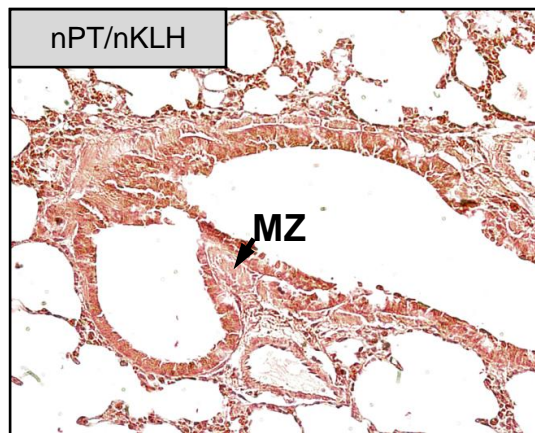
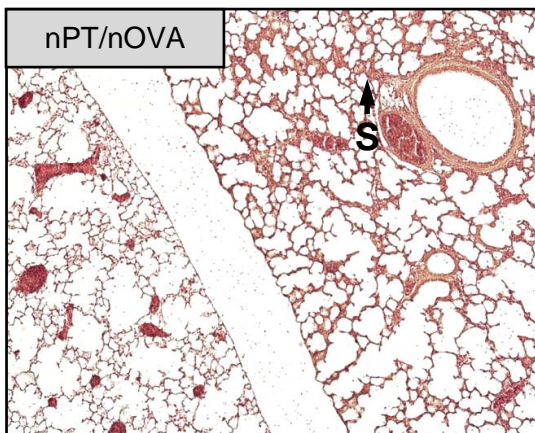
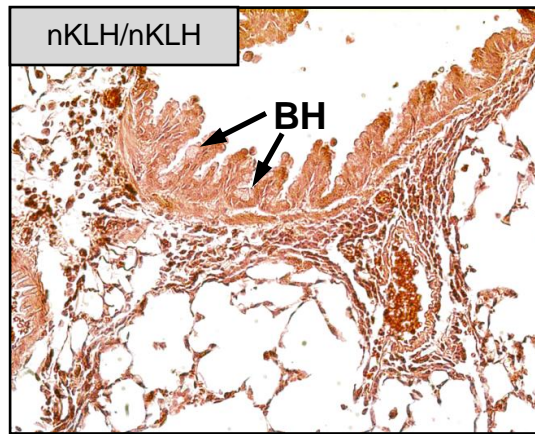
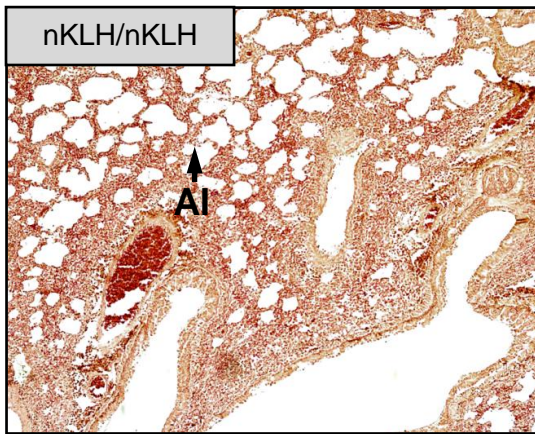
Abbildung 30: Proteingehalt der zellfreien BAL der BALB/c-Versuchsgruppen, li. Werte in $\mu\text{g/ml}$, re. Werte normiert zur Kontrollgruppe (PBS/PBS) $n = 3-12$. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardabweichung, Signifikanzen wurden gekennzeichnet (* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$).

4.3.3 Histologische Veränderungen

Die HE-gefärbten histologischen Präparate der Versuchsgruppen wiesen teilweise imponierende entzündliche Veränderungen des Lungenparenchyms auf. Die pulmonalen Strukturen der PBS/PBS-Gruppe waren filigran. Die Verdichtung des Gewebes durch vermehrte Immunzelleinwanderung und Verdickungen der Septen wurde bei den OVA/OVA- und nOVA/nOVA-Präparaten mit zunehmender Intensität beobachtet (Abb. 31). Neben den luft- und blutleitenden Strukturen war auch das Alveolargewebe stark betroffen. In einigen Lungenabschnitten der nOVA/nOVA-Tiere erschien das Parenchym karnifiziert: Die Septen waren stark verbreitert, die Alveolen konsekutiv eingeengt. Ein entsprechendes Bild fand sich bei Präparaten der nKLH/nKLH-Gruppe. Eine im direkten Vergleich etwas gemäßigte, aber sehr deutliche Inflammation zeigten die nOVA/nKLH-, nPT/nOVA-, nPT/nKLH- und nPT/nPT-Präparate. Die folgenden repräsentativen Bilder veranschaulichen die Veränderungen.

Die Abkürzung **IZS** kennzeichnet Immunzellsäume, **AI** die hier sichtbar wabige Alveolarstruktur, **S** verdickte Septen, **MZ** Muskelzellen und **BH** Becherzellhyperplasien.





Die Abkürzung **IZS** kennzeichnet Immunzellsäume, **AI** die wabige Alveolarstruktur, das **S** verdickte Septen, **MZ** Muskelzellen und **BH** Becherzellhyperplasien.

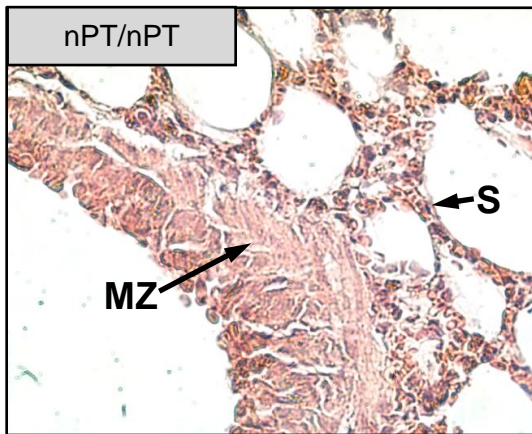


Abbildung 31: Repräsentative histologische Präparatausschnitte (BALB/c-Tiere), HE-Färbung. PBS/PBS, OVA/OVA (Vergrößerung 200x), nOVA/nOVA, nOVA/nKLH, nKLH/nKLH (li. 50x, re. 200x); nPT/nOVA (50x); nPT/nKLH (200x); nPT/nPT (li. 50x, re. 200x, diese Seite 500x).

S Septen, hier verdickt

MZ Muskelzellen

4.3.4 Proteingehalt der Typ-II-Pneumozyten

Bei den Gruppen nKLH/nOVA und nPT/nKLH konnten ausfallbedingt nur zwei Proben pro Gruppe bei der Konzentrationsmessung des Typ-II-Zell-Gesamtproteins eingesetzt werden, weshalb auf eine Varianzanalyse verzichtet wurde.

Vergleichsgruppen	Proteingehalt der Typ-II-Zellen (µg/µl)
PBS/PBS	2,3 ± 0,5
OVA/OVA	6,3 ± 0,8
nOVA/nOVA	8,9 ± 1,0
nOVA/nKLH	3,9 ± 0,4
nKLH/nOVA	4,6 ± 0,3
nKLH/nKLH	7,1 ± 0,9
nPT/nOVA	4,7 ± 0,2
nPT/nKLH	5,4 ± 0,7
nPT/nPT	3,7 ± 0,5

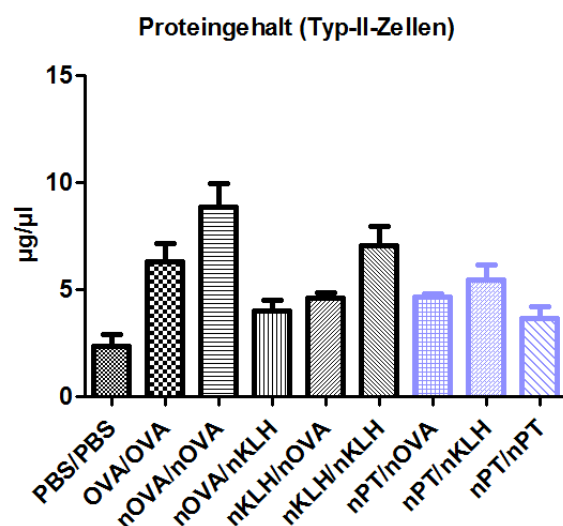


Abbildung 32: Typ-II-Zell-Proteingehalt (µg/µl) der BALB/c-Tiere, n = 3; nKLH/nOVA und nPT/nKLH: n = 2; li.: Wertetabelle, re.: Wertediagramm. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardfehler

4.3.5 Detektion antioxidativer Enzyme

Die antioxidativen Enzyme wurden mittels Immunhistologie, Western Blot und RT-qPCR detektiert.

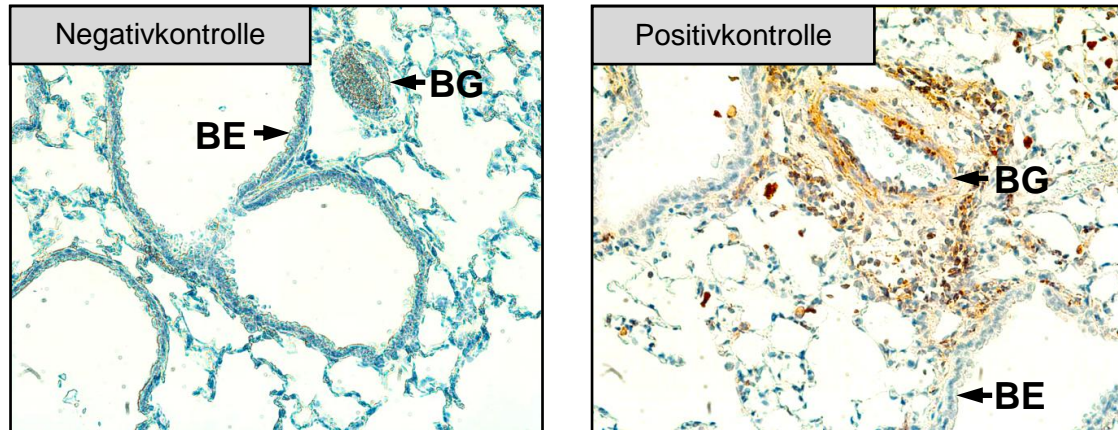


Abbildung 33: Negativkontrolle (PBS) und Positivkontrolle (β -Aktin) der Immunhistologie mit BALB/c-Tieren, Vergrößerung 200x

BE Bronchialepithel

BG Blutgefäß

4.3.5.1 Detektion der Glutathionreduktase

4.3.5.1.1 Immunhistologische Detektion der GR

Der Nachweis der Glutathionreduktase gelang bei den BALB/c-Mäusen in allen Versuchsgruppen. Vor allem die bronchialen Epithelien zeigten die gehäufte rötlich-bräunliche Färbung. Die Intensität der Färbung nahm von der PBS/PBS-Gruppe ausgehend über OVA/OVA bis hin zu nOVA/nOVA deutlich zu (Abb. 34). Eine intensive Färbung war auch bei den nOVA/nKLH- und nKLH/nKLH-Präparaten (Abb. 35) zu beobachten.

Einen vergleichsweise geringen Gehalt an GR zeigten die Präparate der Versuchsgruppen nPT/nOVA, nPT/nKLH und nPT/nPT. Die nPT/nPT-Präparate wiesen vereinzelte Bereiche größerer Anreicherungen auf (Abb. 35).

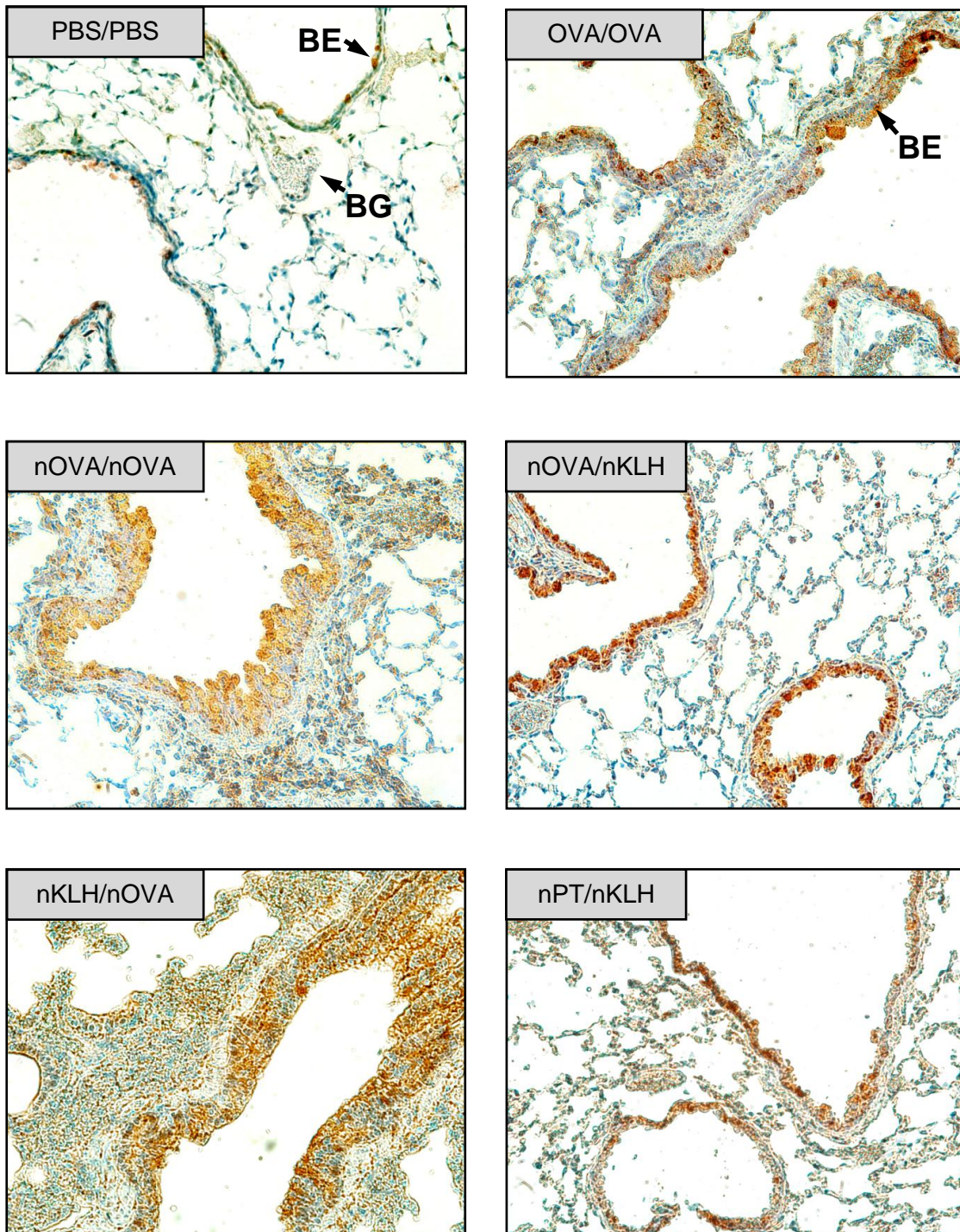


Abbildung 34: Immunhistologischer Nachweis der Glutathionreduktase bei BALB/c-Tieren verschiedener Versuchsgruppen, Vergrößerung 200x

BE: Bronchialepithel

BG: Blutgefäß

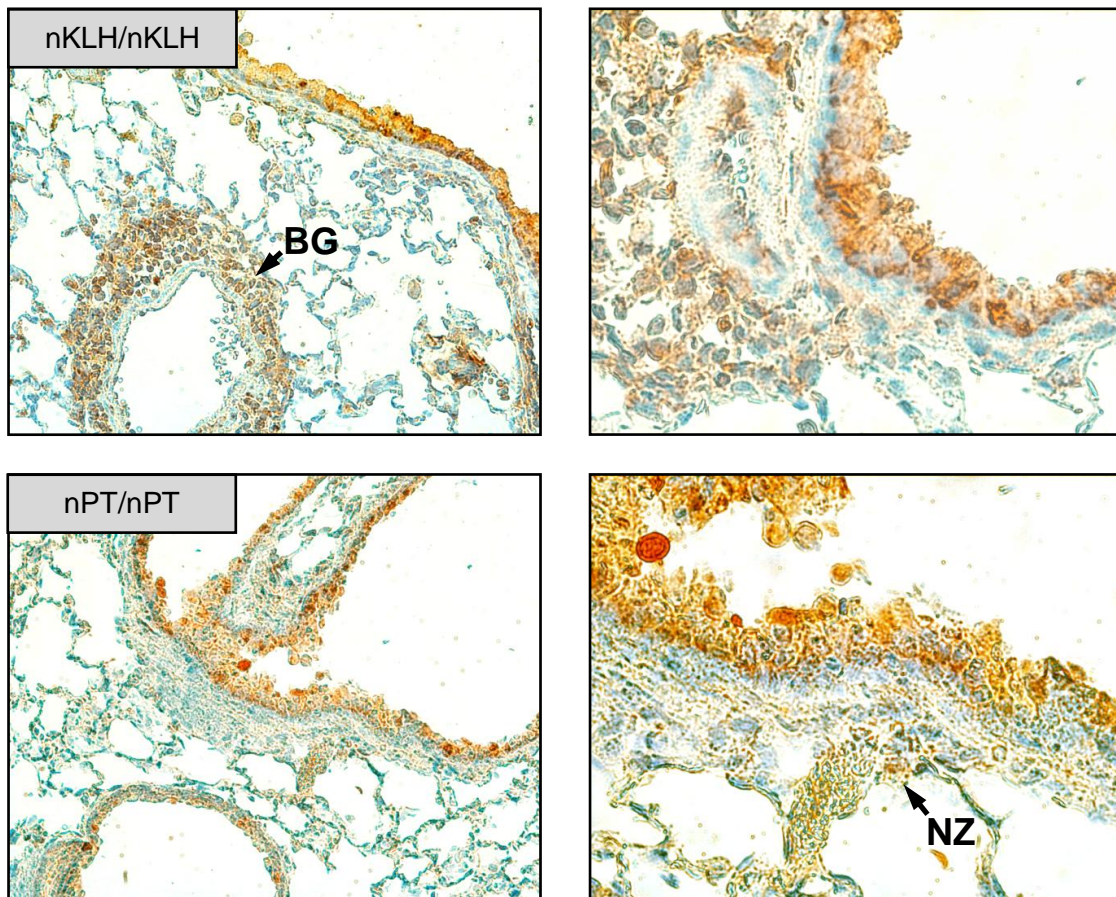


Abbildung 35: Immunhistologischer Nachweis der Glutathionreduktase bei BALB/c-Tieren verschiedener Versuchsgruppen, Vergrößerung li. 200x, re. 500x

BG Blutgefäß

NZ Nieschenzelle/Typ-II-Pneumozyt

4.3.5.1.2 Enzymnachweis der GR mittels Western Blot

Bei der Antikörperdetektion auf GR konnte, entsprechend der Immunhistologie, eine Intensitätsverstärkung der Banden von PBS/PBS über OVA/OVA zu nOVA/nOVA beobachtet werden. Die nOVA/nKLH- sowie die nKLH/nKLH-Gruppenergebnisse fielen im Vergleich zur nOVA/nOVA-Gruppe etwas weniger intensiv aus. Auch bei den nPT/nOVA-, nPT/nKLH- und nPT/nPT-Gruppen konnten schmale Banden detektiert werden.

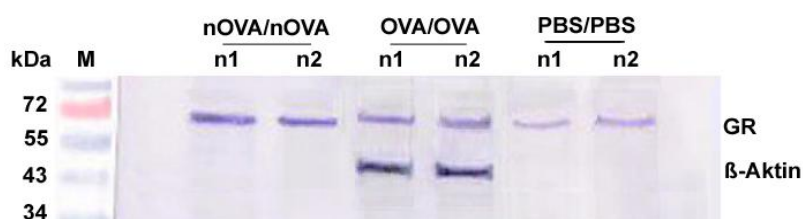


Abbildung 36: Nachweis von Glutathionreduktase in Typ-II-Zellproteinproben (BALB/c-Tiere) mittels Western Blot, M = Marker, n = 3-4 pro Versuchsgruppe. Es fanden wiederholte Messungen statt.

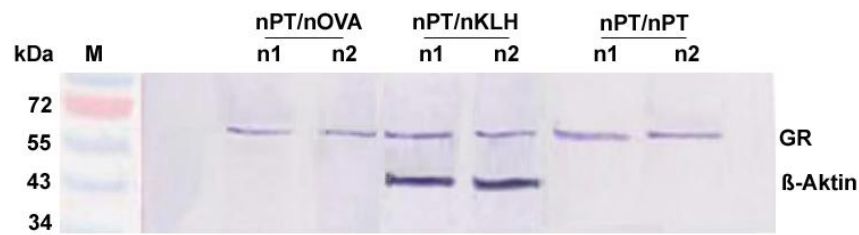


Abbildung 37: Nachweis von Glutathionreduktase in Typ-II-Zellproteinproben (BALB/c-Tiere) mittels Western Blot, M = Marker, n = 3-4 pro Versuchsgruppe. Es fanden wiederholte Messungen statt.

4.3.5.1.3 Genexpression der GR

Bei der Auswertung wies nur die nPT/nPT-Gruppe mit einer relativen Expression von $139 \% \pm 15 \%$ eine höhere Rate auf als die Kontrollgruppe PBS/PBS ($99,9 \% \pm 13 \%$). Im Gegensatz zu den Ergebnissen auf Protein/Enzym-Ebene (Immunhistologie und Western Blot) zeigte sich die Expression der GR der nOVA/nOVA-Gruppe ($44,6 \% \pm 0,6 \%$) auf der m-RNA Ebene deutlich reduziert. Auch bei der nOVA/nKLH- ($68,2 \% \pm 4,3 \%$) und nKLH/nOVA- ($63 \% \pm 3,7 \%$) Gruppe maß man geringe Werte. Die relative Expression lag bei der nKLH/nKLH-Gruppe bei $77,6 \% \pm 10,4 \%$, bei nPT/nKLH bei $79,6 \% \pm 6,6 \%$.

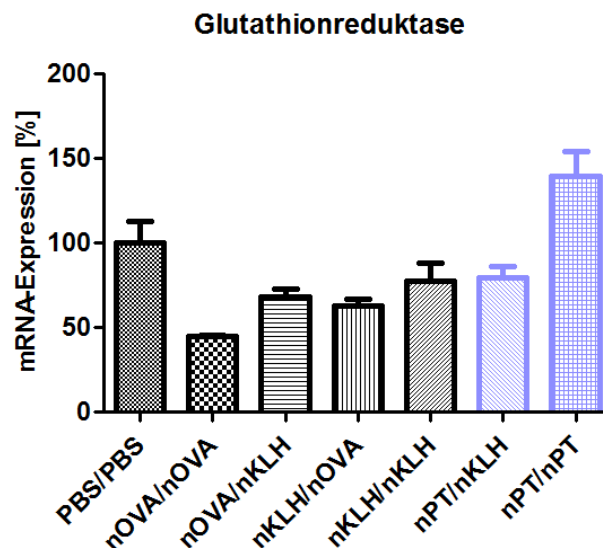


Abbildung 38: m-RNA-Expression der Glutathionreduktase bei BALB/c-Tieren verschiedener Versuchsgruppen, normiert zur Kontrollgruppe (PBS/PBS). Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardfehler, n = 3

4.3.5.2 Detektion auf Glutathionperoxidase 3

4.3.5.2.1 Immunhistologische Detektion der GPX3

Bei der Detektion dieses Enzyms fiel auf, dass sich im perivasalen wie im alveolären Gewebe vermehrt GPX3 nachweisen ließ. Auf Bildern der Gruppen nOVA/nOVA, nOVA/nKLH, nKLH/nKLH und auch nPT/nKLH war dies gut erkennbar (Abb. 39). Die Präparate der mit nitriertem Polytyrosin behandelten Tiere wiesen einen geringeren GPX3-Gehalt auf. Im Vergleich zu den PBS/PBS behandelten Kontrollen zeigten diese Präparate jedoch wiederum einen erkennbar höheren Gehalt (Abb. 40).

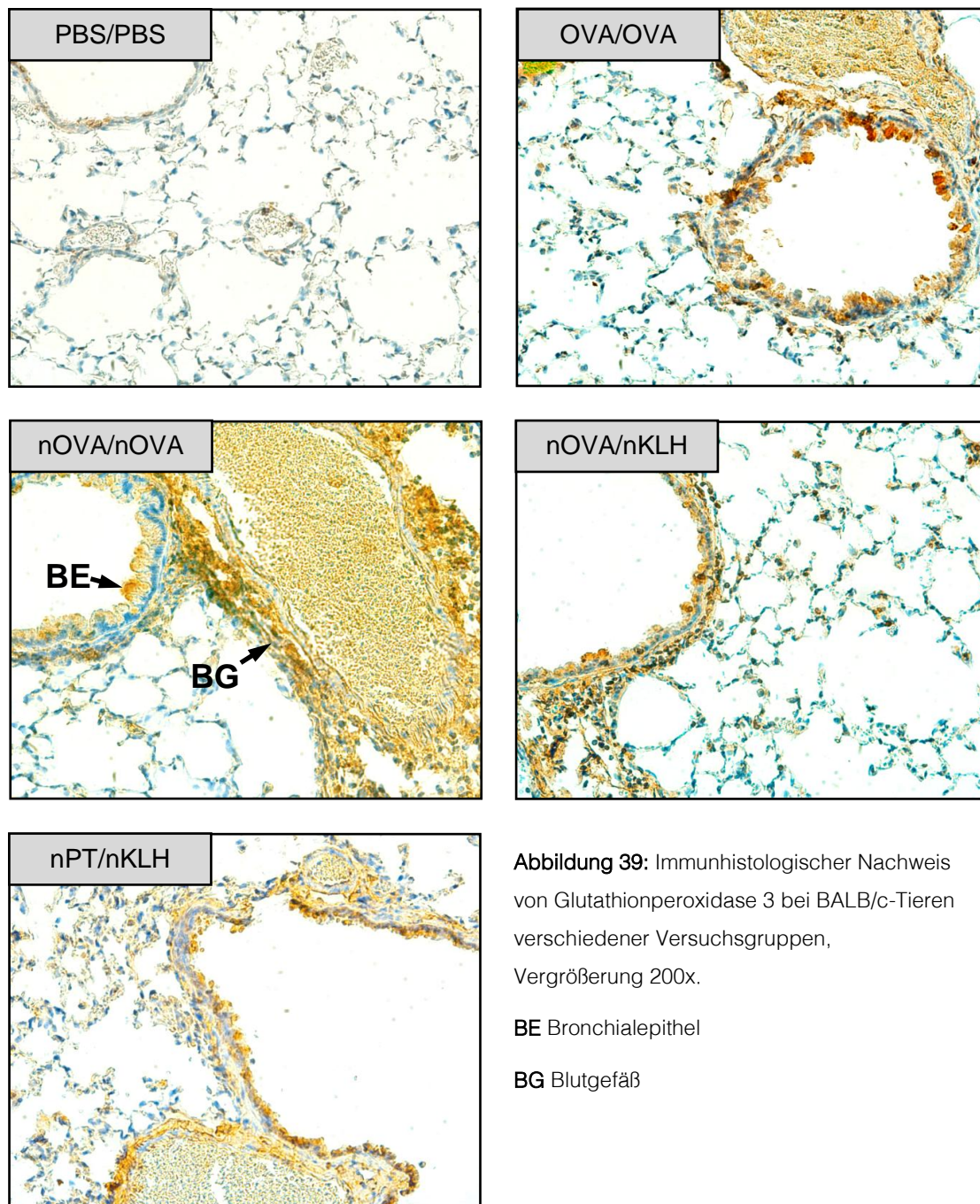


Abbildung 39: Immunhistologischer Nachweis von Glutathionperoxidase 3 bei BALB/c-Tieren verschiedener Versuchsgruppen, Vergrößerung 200x.

BE Bronchialepithel

BG Blutgefäß

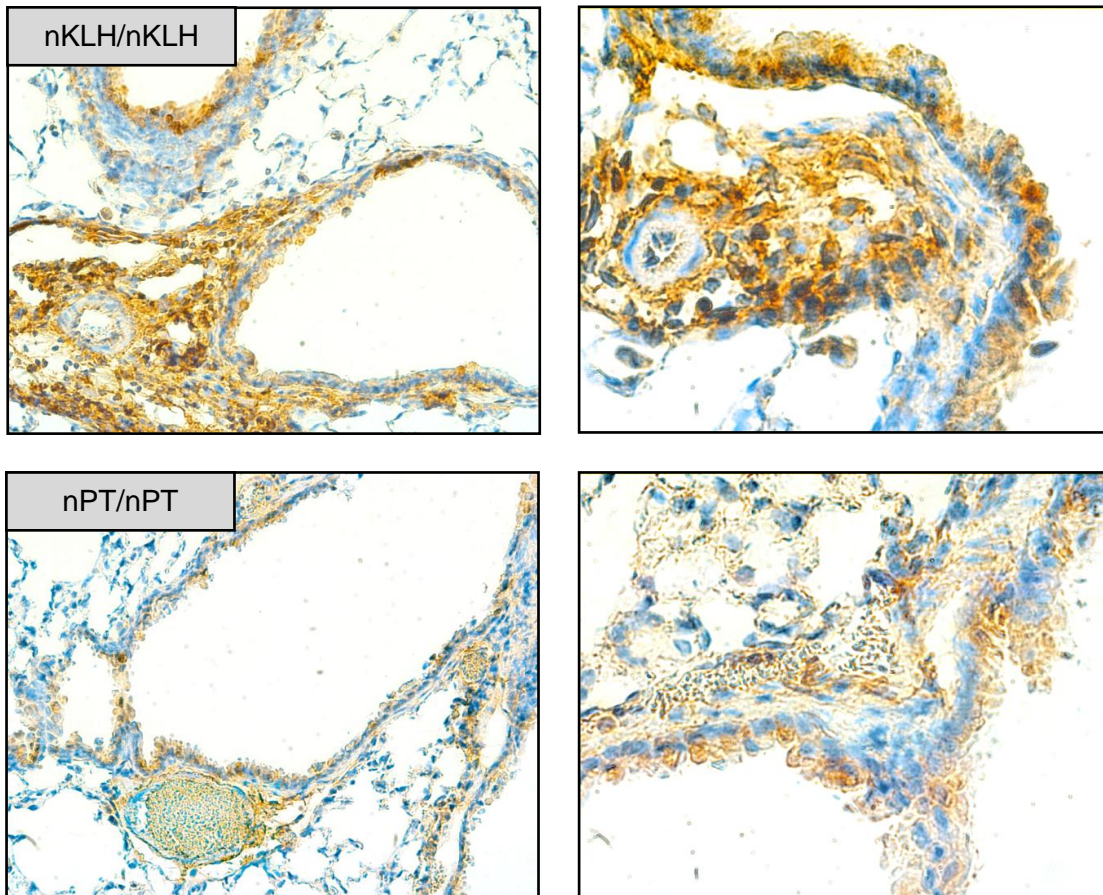


Abbildung 40: Immunhistologischer Nachweis von Glutathionperoxidase 3 bei BALB/c-Tieren verschiedener Versuchsgruppen, Vergrößerung li. 200x, re. 500x

4.3.5.2.2 Enzymnachweis der GPX3 mittels Western Blot

Die Detektionen der Western Blots zeigten, entsprechend der Immunhistologie, einen Glutathionperoxidase 3-Gehalt aller Proben der jeweiligen Versuchsgruppe auf. Hier imponierten die kräftigeren Banden der nKLH/nKLH- sowie der nOVA/nOVA-Gruppen. Bei den BALB/c-Tieren ließ sich der kleinere Teil (molekulare Größe) der GPX3 kräftiger detektieren, die Bande liegt bei ca. 24 kDa, der größere Teil bei ca. 42kDa.

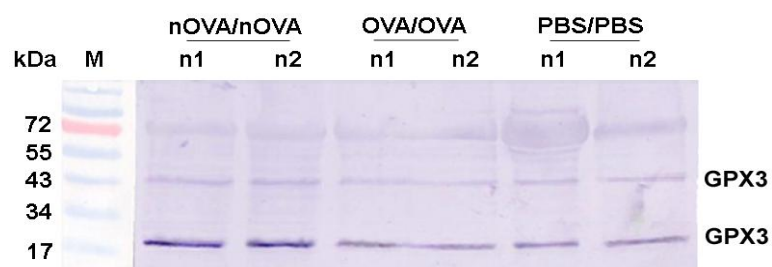


Abbildung 41: Nachweis von GPX3 in Typ-II-Zellproteinproben (BALB/c-Tiere) mittels Western Blot. M = Marker, n = 3-4 pro Versuchsgruppe. Es fanden wiederholte Messungen statt.

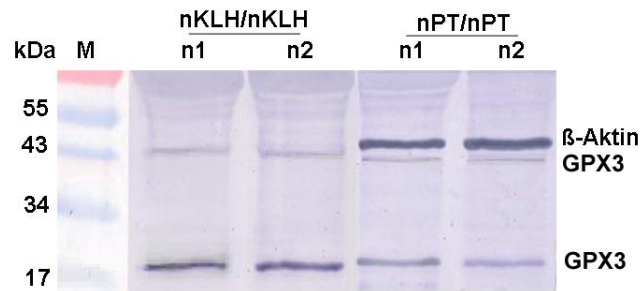


Abbildung 42: Nachweis von GPX 3 in Typ-II-Zellproteinproben (BALB/c-Tiere) mittels Western Blot. M = Marker, n = 3-4 pro Versuchsgruppe. Es fanden wiederholte Messungen statt.

4.3.5.2.3 Genexpression der GPX3

Die Messung der relativen GPX3-Expression ergab für die nOVA/nKLH-(159,5 % \pm 0,5 %), die nPT/nKLH-(140,5 % \pm 1,5 %) und die nPT/nPT-Tiere (125,5 % \pm 8,5 %) Werte oberhalb der Kontrollgruppen-Ergebnisse (PBS/PBS: 99,5 % \pm 0,5 %). Der nOVA/nOVA-Gruppenwert war erneut deutlich reduziert mit 35 % \pm 2 % so auch das nKLH/nKLH-Ergebnis mit 40 % \pm 5,5 %.

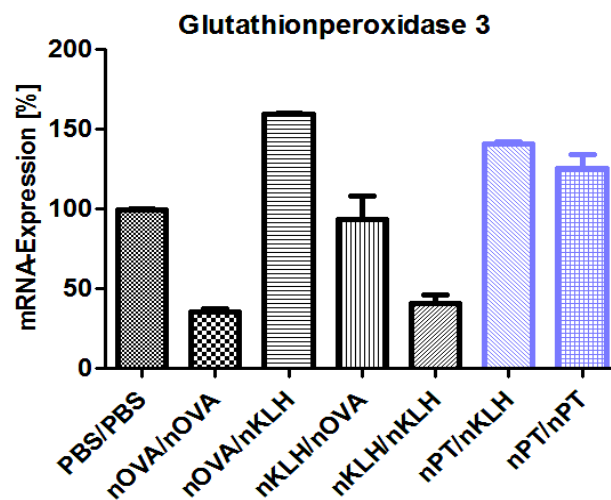


Abbildung 43: m-RNA-Expression der Glutathionperoxidase 3 bei vorbehandelten BALB/c-Tieren, normiert zur Kontrollgruppe (PBS/PBS) n = 3. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardfehler.

4.3.5.3 Detektion auf Glutathionperoxidase 4

4.3.5.3.1 Immunhistologische Detektion der GPX4

Die Detektion auf GPX4 fiel bei den meisten Präparaten negativ aus. Sehr vereinzelt fanden sich Nachweise im bronchialen Epithel der Gruppen PBS/ PBS, nOVA/nKLH und nPT/nPT.

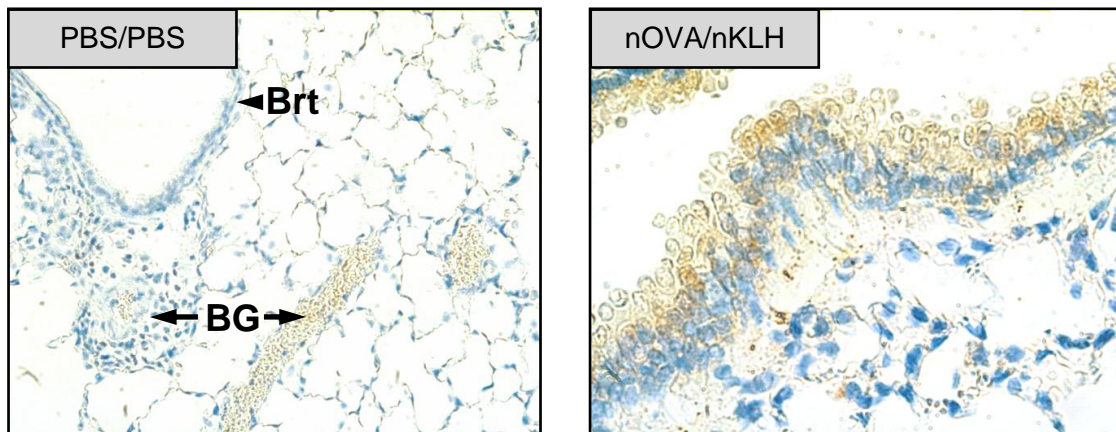


Abbildung 44: Immunhistologischer Nachweis von Glutathionperoxidase 4 bei BALB/c-Tieren, Vergrößerung: li. 200x, re. 500x.

Brt Bronchiolis terminalis

BG Blutgefäß

4.3.5.3.2 Genexpression der GPX4

Im Vergleich zur Kontrolle PBS/PBS ($100 \% \pm 13,8 \%$), zeigten sich die nPT/nPT- ($127,3 \% \pm 3,4 \%$) und die nOVA/nKLH-Werte ($111 \% \pm 4 \%$) erhöht. Dies sind zudem die einzigen Gruppen, welche einen schwachen Nachweis in der Immunhistologie erbrachten, während die anderen Gruppen keinerlei Reaktion aufwiesen. Konträr zur GPX3-Messung, stellte sich die relative Expression der nPT/nKLH-Gruppe deutlich reduziert mit $29,2 \% \pm 3,5 \%$ dar. Der durchschnittliche Wert der nOVA/nOVA-Gruppe lag bei niedrigen $32,3 \% \pm 0,7 \%$.

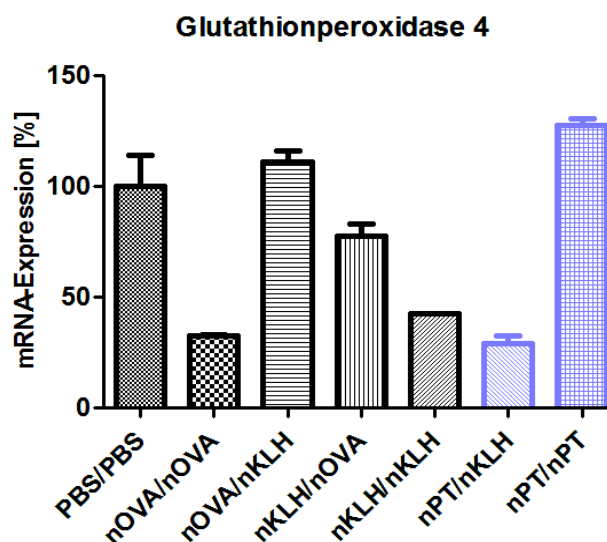


Abbildung 45: m-RNA-Expression der Glutathionperoxidase 4 bei BALB/c-Tieren verschiedener Versuchsgruppen, normiert zur Kontrollgruppe (PBS/PBS), $n = 3$. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardfehler.

5 Diskussion

5.1 Einführung und Hypothesennennung

Da die Inhalation nitrierter Allergene in abgasbelasteten Ballungsräumen ein typisches Phänomen darstellt, wurde die pulmonale Reaktion auf nitrierte Substanzen am murinen Modell getestet. Das Versuchsprotokoll war auf die Erzeugung einer akut-entzündlichen Reaktion ausgelegt (Sensibilisierung (i.p.) an Tag 0, 14 und 21; Provokation (Aerosol) an Tag 26, 27 und 28; Tag 29: AHR Messung; Tag 30: Typ-II-Zell Gewinnung).

Anhand verschiedener Parameter fand die Prüfung dreier Hypothesen bezüglich der Wirkung der nitrierten Substanzen auf die Atemwege statt. Zunächst wurde untersucht, ob die Behandlung mit nitrierten Allergenen eine deutlichere akut-entzündliche Reaktion bei den Versuchstieren hervorruft, als die Behandlung mit den entsprechenden unveränderten Allergenen (1. Hypothese). Hierfür wurde Ovalbumin (OVA) bzw. nitriertes OVA (nOVA) verwendet. Anschließend sollten Kombinationen mit Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) bzw. nitriertem KLH (nKLH) zeigen, ob ein Individuum bei bestehender Allergie gegen ein definiertes nitriertes Allergen auch gegen andere nitrierte Allergene reagiert (2. Hypothese). Die Versuchsreihen wurden in größerem Umfang mit C57BL6-Tieren durchgeführt und durch Versuche mit BALB/c-Tieren ergänzt (siehe Schema Abs. 2.2). Bei den Versuchsreihen mit BALB/c-Tieren wurde zudem die Wirkung von nitriertem Polytyrosin beobachtet um zu klären, ob die Sensibilisierung und Provokation mit der nitrierten Aminosäure ebenfalls zu einer entzündlichen Reaktion führt (3. Hypothese).

Untersucht wurden die Lungenfunktion (Atemwegshyperreagibilität), die Histologie (strukturelle Veränderungen) und die BAL (Zytologie und Proteingehalt). Zudem wurden Typ-II-Pneumozyten aus den Lungen gewonnen, aus welchen man Proteine und RNA isolierte. Anschließend konnte der Proteingehalt gemessen und Western Blots zur Enzymdetektion auf GR und GPX3 und ggf. GPX4 durchgeführt werden. Diese Ergebnisse wurden durch immunhistologische Detektionen auf GR, GPX3 und GPX4 ergänzt. Nach Umwandlung der RNA in cDNA erfolgte die Messung der Genexpression genannter Enzyme mittels RT-qPCR.

5.1.1 Die pulmonalen Entzündungsreaktion am Mausmodell

Die Erforschung entzündlicher Atemwegserkrankungen am Mausmodell ist seit über sechzig Jahren ein etabliertes Verfahren (Reed CE, 1968; Parfentjev IA, 1948). C57BL6- und BALB/c-Tiere sind die meist verwendeten und somit bestuntersuchten Stämme zu diesem Zweck (Van Hove, 2009; Zosky GR, 2007; Karol MH, 1994). Zu berücksichtigende Vor- und Nachteile des murinen Modells sind bei Zosky (2007) und Kips et al. (2003) beschrieben. Verschiedene ältere und neue Studien (Gueders MM, 2009; Takeda K, 2001; De Sanctis GT, 2001; Chiba Y, 1995) weisen zudem auf die genotypischen Unterschiede zwischen Tieren des C57BL6- und des BALB/c-Stammes hin, welche bei der Beurteilung der experimentellen Ergebnisse beachtet wurden.

5.2 Lungenfunktionsmessungen

Die Tiere des BALB/c-Stammes sollen sich für die Erforschung der Lungenfunktion bei akuten und milderen Atemwegs-entzündungen besonders eignen, insbesondere bei Provokation mit Methacholin (MCH). Sie zeigen eine deutlichere Atemwegshyperreagibilität als Tiere des C57BL6-Stammes (Van Hove, 2009; Takeda K, 2001). C57BL6-Tiere werden bevorzugt für die Erforschung der inflammatorischen Morphologie und von zellulären Veränderungen bei schweren pulmonalen Entzündungen eingesetzt (Gueders MM, 2009). Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden den Lungenfunktionsmessungen an C57BL6-Tieren Versuchsreihen mit BALB/c-Tieren angeschlossen. Die Auswertung der invasiven AHR-Messung mit C57BL6-Tieren erbrachte keine richtungsweisenden Ergebnisse, was auf die geringe Reagibilität dieses Stammes auf MCH-Provokation (De Sanctis GT, 2001) zurückgeführt wurde.

Prinzipiell ist die invasive Methode die Geeignete für das akute Asthmodell, da keine wiederholten Messungen notwendig sind und die anschließende Lungenentnahme möglich ist. Sie wurde hier zudem aufgrund ihrer hohen Sensitivität¹⁵ und der geringen Tierzahl pro Versuchsgruppe gewählt (s.a. Glaab T, 2005).

Es wurden eindeutige Resultate bei der Vermessung der BALB/c-Tiere erwartet, jedoch stellte man auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen fest. Für die invasive AHR-Messung der BALB/c-Tiere konnten

¹⁵ keine Verfälschung der pulmonalen Widerstandsmessung durch die oro-nasale Resistenz

nur 3 Tiere im Rahmen dieser Studie verwendet werden. Bei der Fehleranalyse wurde die zu geringe Tierzahl als Erklärung für die unklaren Resultate herangezogen. Darüber hinaus ist die individuelle Wirkung der Anästhetika auf den murinen Organismus nicht klar definiert.

Versuche mit C57BL6-Mäusen unter Verwendung vergleichbarer Behandlungsschemata wurden bisher nur unter Einsatz von Stickstoffdioxid in Verbindung mit potentiellen Allergenen durchgeführt. Da bisher wenig vergleichbares Forschungsmaterial veröffentlicht wurde, werden die Studien von Bevelander et al. und Poynter et al. zur Diskussion herangezogen. Bevelander et al. veröffentlichten 2007 eine Studie, in der 3 Versuchsgruppen weiblicher C57BL6-Mäuse (n = 4-6) nach Sensibilisierung und Provokation einer invasiven Lungenfunktionsmessung unterzogen wurden. Zur Sensibilisierung wurde ein Gemisch aus Stickstoffdioxid (10 ppm) in Verbindung mit OVA-Aerosol (Versuchsgruppe: Geringe Allergenkonzentration), zur Scheinsensibilisierung alleiniges Ova-Aerosol (Negativkontrolle, kein NO₂) und zur regulären Sensibilisierung eine Mischung aus Aluminiumhydroxid und OVA i.p. injiziert (Positivkontrolle), zur Provokation ließ man die Tiere an 3 Tagen ein OVA-Aerosol inhalieren.

Die Lungenfunktionsmessung mit MCH-Provokation ergab keinen Unterschied zwischen der positiv Kontrolle und der Versuchsgruppe, beide Gruppen reagierten sehr empfindlich und deutlich (erniedrigte Reaktionsschwelle). Bevelander et al. beschrieben entsprechende Ergebnisse auch bei Versuchsdurchführungen mit BALB/c-Tieren. Dies unterstützte ihre These, dass eine an sich nicht immunogene Allergen-Dosis in Verbindung mit Stickstoffdioxid zu asthmatischen Symptomen führt.

Im Jahre 2005 setzten Poynter et al. OVA sensibilisierte und provozierte C57BL6-Mäuse für 3 bis 5 Tage einem Aerosol mit einer Stickstoffdioxidkonzentration von 5 ppm oder 25 ppm aus. Nach einer 20-tägigen Erholungszeit wurde bei der mit 25 ppm behandelten Gruppe eine anhaltende und deutlich gesteigerte Atemwegshyperreagibilität festgestellt (invasive Messung), während die mit 5 ppm behandelten Tiere nicht auffällig reagierten. Dies unterstützt die von Bevelander (s.o.) erhobenen Ergebnisse, die nach Austestung verschiedener Stickstoffdioxidkonzentrationen einen Mindestgehalt von 10 ppm Stickstoffdioxid in der Luft als pathologischen Schwellenwert ergaben.

Es existieren bisher keine Veröffentlichungen über murine Lungenfunktionsmessungen nach Behandlung mit nitrierten Proteinen.

Die hier durchgeführten Messungen sollten mit größerer Tierzahl wiederholt werden, um die Auswirkung auf den Atemwegswiderstand erfassen zu können. Zudem wird die Suche nach der idealen AHR-Messungsmethode¹⁶ von Nagern fortgeführt und neue Erkenntnisse werden künftige Studien erleichtern (Agrawal A, 2008; Bates JH, 2003).

5.3 Studien an C57BL6-Tieren

5.3.1 Die Lavage: Zytospinpräparation und Proteinkonzentration

Anhand der Zytospinpräparate wurden die Zellzahlen und die anteiligen Zellpopulationen berechnet, die repräsentativen Abbildungen der Präparate zeigten deutliche Differenzen zwischen den Versuchsgruppen (Abs. 4.2.3). Zudem bestimmte man den Proteingehalt der zellfreien Lavageflüssigkeit.

Mit Ovalbumin bzw. mit nitriertem Ovalbumin behandelte Versuchsgruppen wiesen im Durchschnitt einen leichten Anstieg der Gesamtzellzahl im Vergleich zu den Kontrollen auf. Auch in Kombination mit nitriertem KLH zeigte sich diese Erhöhung. Die mit auffälligem Abstand höchsten Zellzahlen wurden bei den Kombinationen nOVA/nOVA und nKLH/nKLH ausgezählt. Die genannten Gruppen zeichneten sich bei der Populationsanalyse zudem durch einen ca. 70 %igen Anteil an eosinophilen Granulozyten aus, bei der Versuchsgruppe nKLH/nKLH lag er sogar bei 95 %. Nach den Makrophagen konnten hier auch vermehrt Lymphozyten und neutrophile Granulozyten gezählt werden.

Diese Ergebnisse bestätigen die erste aufgestellte Hypothese: Die Veränderungen der Zellzahlen und die Zellzusammensetzung lassen auf einen additiven Effekt der Proteinnitrierung auf die Genese einer allergisch-entzündlichen Immunreaktion schließen. Der hohe Anteil eosinophiler Granulozyten zeigt die Aktivierung des T_H2-Pfades an, da das T_H2-Zytokin IL-5 als wirkungsvollster Stimulus für die Aktivierung und das Überleben eosinophiler Granulozyten gilt. Am deutlichsten wurde dies zumeist bei Versuchskombinationen sichtbar, welche mit der gleichen nitrierten Substanz sowohl sensibilisiert als auch provoziert worden waren. Aber auch

¹⁶ Reproduzierbarkeit, Ablauf unter physiologischen Bedingungen

Versuchskombinationen wie nOVA/nKLH oder OVA/nOVA wiesen eine erhöhte Gesamtzellzahl sowie einen erhöhten Anteil eosinophiler Granulozyten auf.

Die Auswertung der von Poynter et al. beschriebenen OVA/OVA behandelten C57BL6-Tiere, die anschließend Stickstoffdioxid (25 ppm) ausgesetzt wurden, ergab im Vergleich zu OVA/OVA (ohne NO₂) behandelten Tieren eine wesentlich massivere zelluläre Entzündungsreaktion. Eine bis zu zehnfach höhere Anzahl eosinophiler Granulozyten und vermehrt neutrophile Granulozyten und Makrophagen wurden gezählt. Zusätzlich bestimmten Poynter et al. den Marker Laktatdehydrogenase (LDH), welcher aus zerstörten und geschädigten Zellen austritt und somit proportional zum Zellschadigungsgrad ansteigt. Interessanterweise war der Wert von mit 25 ppm Stickstoffdioxid behandelten Tieren nach ein- und auch nach dreitägiger Inhalation gegenüber den LDH-Werten Raumluft ausgesetzter Tiere signifikant ($p \leq 0,01$) erhöht. Auch die von Bevelander et al. mit 10 ppm Stickstoffdioxid (getesteter Schwellenwert s.o.) und Ova-Aerosol sensibilisierten C57BL6-Tiere zeigten nach der Provokation mit OVA-Aerosol in der Lavage eine massive Erhöhung der eosinophilen Granulozyten und eine gesteigerte Lymphozyteneinwanderung. Vermehrte Lymphozytenzahlen wurden auch in der vorliegenden Studie insbesondere bei nOVA/nOVA behandelten C57BL6-Tieren ausgezählt.

Bevelander et al. berechneten neben dem durchschnittlichen Gesamtproteingehalt der BAL zudem den LDH- und HSP70¹⁷-Gehalt und beobachteten gegenüber der Kontrolle eine signifikante Erhöhung ($p \leq 0,01$) des Gesamtproteins und des HSP70 sowie eine signifikante Erhöhung ($p \leq 0,05$) des Schädigungsparameters LDH. In der vorliegenden Arbeit wurden die Lavagen der verschiedenen Versuchsgruppen ebenfalls auf ihren Gesamtproteingehalt untersucht und verglichen. Hier wiesen die Gruppen¹⁸ nach Behandlung mit nitrierten Proteinen im Vergleich zu den Kontrollgruppen erhöhte Werte auf. Die Gruppen nOVA/nOVA, nOVA/nKLH und nKLH/nKLH zeigten jedoch geringere Proteingehälter als die OVA/OVA-Gruppe auf. Zur Klärung solcher Ergebnisse sollte bei zukünftigen Versuchen die Proteinzusammensetzung der BAL in Gruppen wie OVA/OVA, nOVA/nOVA und nOVA/nKLH im Vergleich zur Kontrolle PBS/PBS ermittelt werden. Im Hinblick auf die Histologie wäre die Bestimmung des Schädigungsmarkers LDH interessant, da bei vielen Versuchsgruppen destruiertes Parenchym unter dem Mikroskop sichtbar wurde. In der Zytologie und der Proteinbestimmung der C57BL6-Mäuse unterschieden sich die

¹⁷ Hitzeschockprotein, Funktion: Korrekte Faltung und Aktivierung von Proteinen

¹⁸ OVA/nOVA, nOVA/nOVA, nOVA/nKLH und nKLH/nKLH

Gruppen nOVA/nKLH zwar tendenziell, jedoch nicht signifikant von den Kontrollen. Aus diesem Grund müssen zur Beurteilung der 2. Hypothese weitere Untersuchungsergebnisse mit einbezogen werden. Genauer wird auf diese Hypothese in Absatz 5.4.4 eingegangen, da erst eine Vergleichsstudie über Kreuzreaktivitäten zwischen nitrierten Allergenen unter Verwendung von BALB/c-Mäusen weitere Aussagen ermöglicht.

Insgesamt wird die 1. Hypothese der vorliegenden Arbeit von den Ergebnissen und Ergebnis-Tendenzen genannter Studien von Poynter et al. und Bevelander et al. gestützt.

5.3.2 Histologische Veränderungen

Die repräsentativen Bilder im Abs. 4.2.2 geben die morphologischen Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen deutlich wieder. Alle Präparate der Versuchsgruppen wurden mit den Kontrollpräparaten der Gruppe PBS/PBS verglichen. Mit Hilfe eines Score-Systems wurden der Grad peribronchialer und perivaskulärer Immunzeleintrwanderung sowie Strukturveränderungen beurteilt. Die Auswertungen ergaben sichtbare akut-pathologische Parenchymveränderungen für Versuchsgruppen, welche sowohl bei der Sensibilisierung, als auch bei der Provokation mit nitrierten Allergenen behandelt worden waren. Dies entsprach den Ergebnissen der Lavage-Auswertungen und bestätigte die 1. Hypothese. Die bei der allergischen Reaktion aktivierten T_H2-Zellen regen eine weitere IgE-Produktion der B-Zellen an. Dies bewegt die Entzündungszellen zur Antigenpräsentation und führt zur Degranulation zytoplasmatischer Vesikel der Mastzellen, eosinophiler und basophiler Granulozyten. Das enthaltene Histamin, de novo synthetisierte Eikosanoide und Reaktive Spezies bedingen die Kontraktion glatter Muskelzellen, Schleimsekretion und Vasodilatation (s.a. Hamid Q, 2009). Diese Prozesse erklären die Klinik des Asthmas und die beobachteten histologischen Veränderungen des Lungengewebes.

Eindrucksvolle Veränderungen zeigten auch die nOVA/nKLH-Präparate. Ihre Histologie unterstützte die 2. Hypothese, da die akut-entzündlichen Veränderungen nach Behandlung mit 2 nitrierten, nicht kreuzreaktiven Allergenen eintraten.

Sowohl Bevelander et al. als auch Poynter et al. verwendeten ein der vorliegenden Arbeit ähnelndes histologisches Bewertungsschema zur Beurteilung ihrer Präparate, was die Vergleichbarkeit der Ergebnisse verbessert. Poynter et al. erkannten bei OVA/OVA behandelten Tieren nach dreitägiger Stickstoffdioxid-Inhalation

(6 h pro Tag) eine deutliche Verschärfung der Entzündung¹⁹, das Zellbild war von eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten dominiert.

Entsprechende zelluläre und strukturelle Veränderungen wurden von Bevelander et al. bei Versuchsgruppen nach NO₂-OVA-Aerosol-Sensibilisierung mit anschließender OVA-Provokation beobachtet.

5.3.3 Enzym-Detektion und -Expression in Typ-II-Zellen

Der Gesamtproteingehalt der isolierten Typ-II-Zellen fiel bei den C57BL6-Tieren sehr heterogen aus. Zwischen Kontrolltieren (PBS/PBS) und den Versuchsgruppen ergab sich kein signifikanter Unterschied. Der Kontrollwert glich dem der Versuchsgruppe nKLH/nKLH. Es folgten immunhistologische Färbungen von Schnittpräparaten, unterstützt von Westernblots mit Typ-II-Zell-Proteinen, um Aufschluss über den Gehalt unterschiedlicher Enzyme des antioxidativen Glutathionsystems geben. Hier detektierte man die Glutathionreduktase (GR) sowie die Glutathionperoxidase 3 und 4 (GPX3, GPX4).

Neben der für die Reduktion von GSSG zuständigen GR existieren 4 Selenium-abhängige Glutathionperoxidasen (GPX1-4) welche die Oxidation von GSH katalysieren. GPX3 und 4 spielen eine wichtige Rolle bei der Reduktion von Hydroperoxiden und Lipid-Peroxidasen (Hochscheid R, 2005).

Generell stehen Störungen des Glutathionhaushalts im Verdacht zur Entstehung einer Allergie- und Asthmaerkrankung maßgeblich beizutragen (Rogers A, 2011). Verschiedene Studien mit Asthmatikern und Allergikern stellen die verminderte Konzentration antioxidativer Parameter des Glutathionsystems heraus, z.B. erniedrigte GSH-Spiegel, reduzierte Glutathionperoxidasen-Spiegel in Serum oder Epithelial Lining Fluid/ELF (siehe Al-Afaleg 2011; Fitzpatrick AM, 2009; Perisić T, 2007). Therapien zur Verbesserung des antioxidativen Status im Respirationstrakt, z.B. mithilfe von GSH-Aerosolen, werden derzeit diskutiert (Pauluhn J, 2011; Rahman I, 2011; Fechter LD, 2008; Rahman I, 2005).

In der vorliegenden Arbeit ergab die Detektion der Glutathionreduktase mittels Immunhistologie bei C57BL6-Mäusen intensive bronchoepitheliale Nachweise in den Präparaten der Kontrollgruppe PBS/PBS, während das Alveolargewebe hier kaum markiert wurde.

¹⁹ distale bronchiale Läsionen, peribronchiale und perivaskuläre Entzündungszellsäume

Eine gleichmäßige Markierung von Gewebe und Epithel wurde bei den OVA/OVA- und den nOVA/nKLH-Tieren festgestellt und in schwächerem Maß auch bei den Gruppen OVA/nOVA und nKLH/nKLH.

Eine Stressreaktion der Kontrolltiere, unter anderem gekennzeichnet durch eine hohe epitheliale Bereitstellung von GSH mit Hilfe der GR, ist nach Versuchsdurchlauf einschließlich Inhalation des Kontrollaerosols bei der Provokation nicht auszuschießen.

Bei den Versuchsgruppen können die Detektionen innerhalb des Alveolargewebes für eine ubiquitäre Abwehrreaktion und Verletzung der Blut/Luft Schranke sprechen, da auch Endothelzellen einen hohen Gehalt an GR aufwiesen und die HE-Färbungen Strukturschäden sichtbar machten (s. Abs. 4.2.5.1.1 Abb.18 und Abs. 4.2.3., Abb. 13, 14). Die ergänzten Western-Blot Ergebnisse mit Detektion auf GR ließen keine gruppenspezifischen Unterschiede erkennen. Bei einer nur bedingt vergleichbaren Studie von Hochscheid et al 2005, bei welcher Ratten u.a. akut für 3 Tage stickstoffhaltigem Aerosol (10 ppm) ausgesetzt wurden (n = 4-6), konnte eine erhöhte GR-Aktivität der Typ-II-Pneumozyten gemessen werden.

Die immunhistologische Detektion auf GPX3 zeigte bei allen Versuchsgruppen eine deutliche bronchoepitheliale sowie parenchymale Anreicherung. Die Ergebnisse der nOVA/nKLH-Gruppe wiesen einen hohen GPX3 Gehalt auf, was auf eine Allergen-unabhängige Reaktion hindeutete. Die Westernblots mit Typ-II-Zell Proteinen unterstützten die immunhistologischen Beobachtungen durch deutliche Detektion von GPX3-Banden bei Proben der nOVA/nKLH- und der nOVA/nOVA-Gruppe, die Banden der Kontrollgruppen waren schwach sichtbar. Auch bei Hochscheid et al. ergab eine Aktivitätsmessung der Typ-II-Zellen eine signifikante Steigerung der Glutathion-peroxidase-Aktivität nach akuter Belastung mit Stickstoffdioxid.

Bei einer Studie von White et al. (1995) wurden in vitro nach 24-stündiger NO₂-Inkubation von Ratten auch in pulmonalen Fibroblasten erhöhte zelluläre GSH-Werte gemessen.

In der RT-qPCR maß man die höchsten Expressionen aller 3 Enzyme in Typ-II-Zell-cDNA der Kontrollgruppen (PBS/PBS). Insbesondere die Expression der GPX4 war bei den Versuchsgruppen gegenüber den Kontrollen z.T. signifikant erniedrigt. Zum post-translationalen Enzymstatus gegenläufige Genregulationen sind möglich.

Hochscheid et al. stellten ebenfalls Expressionsreduktionen der GPX3 und der GPX4 in Typ-II-Zellen von Versuchstieren nach akuter Stickstoffdioxidbelastung fest, während nach einer Langzeitbehandlung (10 ppm NO₂-Aerosol für 20 Tage) deutlich

höhere Expressionen insbesondere der GPX4 und der GR gegenüber den Kontrollen gemessen wurden. Hieraus ergibt sich die Vermutung, dass die Differenzierung der Typ-II-Pneumozyten zu Typ-I-Pneumozyten gegenüber der antioxidativen Enzymexpression bei akuter Belastung im Vordergrund steht.

Es existieren keine weiteren Untersuchungen des antioxidativen Status muriner Typ-II-Zellen nach Behandlung mit nitrierten Proteinen *in vivo*. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen genannte Tendenzen, jedoch kaum Signifikanzen, weshalb eine Überprüfung mit größerer Fallzahl erfolgen sollte. Bei weiteren Nachforschungen wäre es weiterhin interessant auch Parameter des GSH-Systems aus dem Serum und der frischen Lavage der Tiere zum Vergleich heranzuziehen.

5.4 Studien an BALB/c-Tieren und Vergleich mit C57BL6-Stamm

5.4.1 Bronchoalveoläre Lavage

Die ergänzten Versuchsreihen mit BALB/c-Tieren ergaben erhöhte Zellzahlen für Gruppen, welche mit einem Allergen provoziert worden waren (OVA oder KLH). Sowohl bei den C57BL6-, als auch bei den BALB/c-Tieren traten die hohen Zellzahlen der Versuchsgruppen nOVA/nOVA und nKLH/nKLH hervor. In beiden Stämmen wurden die Zellbilder von eosinophilen Granulozyten dominiert, auch wurden hier im Vergleich mehr Lymphozyten und neutrophile Granulozyten beobachtet (siehe auch Abs. 4.2.1, repräsentative Abbildungen).

Dies entspricht den von Gueders et al. und Van Hove et al. (2009) erhobenen Ergebnissen, welche eine deutliche eosinophile Akutreaktion nach OVA-Provokation beider Stämme beschrieben. Wie bei C57BL6-Tieren der nOVA/nKLH-Gruppe beobachtet, wiesen auch Versuchskombinationen wie nOVA/nKLH und nKLH/nOVA (BALB/c) im Vergleich zur Kontrolle PBS/PBS eine erhöhte Gesamtzellzahl und einen erhöhten Anteil eosinophiler Granulozyten auf. Der Gesamtproteingehalt der BAL war in allen Versuchsgruppen der BALB/c-Tiere und insbesondere bei den Gruppen nOVA/nOVA und nKLH/nKLH signifikant erhöht.

Wie in Abs. 5.3.1 erwähnt, ist bei zukünftigen Untersuchungen eine Bestimmung der genauen Proteinzusammensetzung und von Schädigungsmarkern sinnvoll.

5.4.2 Histologische Veränderungen

Sowohl Gueders et al. als auch Van Hove et al. beobachteten in beiden Stämmen deutlichen Zellinflux, auffällige peribronchiale und perivaskuläre Inflammation sowie Verbreiterungen der glatten Muskelzellschicht und Becherzellhyperplasien bei OVA behandelten Tieren. Van Hove beschrieb insbesondere akute Verdickungen der Alveolarwände bei BALB/c-Tieren. Dies bestätigend fiel die Histologie der BALB/c-Tiere auch in der vorliegenden Studie eindrucksvoller aus als die der C57BL6-Tiere. Beide Stämme zeigten deutliche Parenchymveränderungen nach Allergen-Behandlung. Wabige Verplumpungen der Strukturen durch massive Zellinfiltration und Muskelzellhyperplasie sowie Becherzellhyperplasie, waren insbesondere bei BALB/c-Tieren der OVA/OVA-, nOVA/nKLH- und nKLH/nKLH-Gruppen sichtbar, siehe Abs. 4.3.3, Abbildung 31. Die Ergebnisse der BAL-Untersuchung und der Histologie der BALB/c-Tiere unterstützen insgesamt die bei C57BL6-Tieren beobachteten Reaktionen und stellen den entzündungsfördernden Effekt der Proteinnitrierung heraus (1. Hypothese). Eine mögliche durch Nitrierung hervorgerufene Kreuzreaktivität der Allergene kann nicht ausgeschlossen werden (2. Hypothese).

5.4.3 Enzym-Detektion und Expression in Typ-II-Zellen

Die Detektion von Glutathionreduktase und Glutathionperoxidase 3 gelang sowohl in der Immunhistologie als auch im Westernblot aller Gruppen der BALB/c-Tiere, wobei nach Behandlung mit nitrierten Substanzen ein deutlich höherer Enzymgehalt nachgewiesen wurde.

Die RT-qPCR mit BALB/c-Tieren auf GR, GPX3 und GPX4 erbrachte für die Versuchsgruppen nOVA/nOVA, nKLH/nKLH und nKLH/nOVA ähnlich Ergebnisse wie bei C57BL6-Tieren. Gegenüber den Kontrollen waren die Expressionen hier reduziert. Die These einer akuten Down-Regulation der Genexpression dieser Enzyme innerhalb der Typ-II-Zelle scheint dadurch tendenziell unterstützt. Lediglich die Versuchsgruppe nOVA/nKLH zeigte für die Enzyme GPX3 und 4 eine leicht über dem Kontrollniveau erhöhte Expression.

Bisher wurden nur in der Veröffentlichung von Gruijthuijsen et al. (2006) Untersuchungen mit nitrierten Proteinen in vitro und in vivo an BALB/c-Tieren beschrieben. Allerdings testete man deren Wirkung an Milzzellen transgener

Do11.10²⁰ BALB/c Mäuse (in vitro) und an isolierten Milzzellen unveränderter BALB/c-Tiere nach in vivo-Sensibilisierung. Die Studie beschäftigte sich jedoch mit gleicher Fragestellung:

Kann es durch Nitrierung zur Verstärkung des allergischen Potentials eines Proteins und zu Kreuzreaktivitäten verschiedener nitrierter Substanzen kommen?

Die Milzzellen transgener BALB/c-Tiere reagierten nach Behandlung mit nitriertem OVA in vitro mit einer 3-fach erhöhten Proliferationsrate verglichen mit unverändertem oder scheinnitriertem OVA. Eine Stimulation dieser Zellen mit nitriertem Birkenpollenallergen (nBet v 1a) führte allerdings zu keiner Proliferation, was auf eine allergenspezifische (OVA) Reaktion schließen ließ. Hierdurch wurde nitriertes OVA als wirkungsvollster Stimulus der DO11.10 Milzzellen identifiziert, die Hypothese einer Kreuzreaktivität aufgrund der Nitrierung wurde hierdurch nicht unterstützt.

Die entnommenen Milzzellen zuvor nOVA-sensibilisierter BALB/c-Tiere (in vivo-Untersuchung) zeigten signifikant höhere mittlere und maximale Proliferationswerte bei Stimulation, verglichen mit OVA-sensibilisierten Tieren ($p < 0,05$). Wie bereits erwähnt hat die Produktion des mit T_H2 -Zellen assoziierten Zytokins IL-5 großen Einfluss auf die Regulation eosinophiler Granulozyten im Entzündungsgeschehen. Die IL-5-Produktion fiel nach Antigenstimulation der Zellen bei nOVA-sensibilisierten Tieren signifikant höher aus, insbesondere nach Stimulation mit nOVA ($p < 0,05$). Bei diesen Tieren ergaben Serum-Untersuchungen zudem signifikant höhere nOVA-spezifische IgE- als auch IgG₁²¹-Werte.

Zudem konnte bei diesen Tieren, nach Sensibilisierung mittels nOVA und anschließender Stimulation mit nBet v 1a, bei 3 von 6 Mäusen kreuzreaktive IgG- und IgE-Antikörper gefunden werden - dies unterstützt die 2. Hypothese.

Bei einem weiteren Versuch wurde an Stelle des Ovalbumins für die Vorbehandlung der BALB/c-Tiere nitriertes und nicht nitriertes Birkenpollenallergen (Bet v 1a und nBet v 1a) verwendet. Die Splenozytenproliferation und die IL-5 Produktion waren nach nBet v 1a Sensibilisierung höher als nach Bet v 1a Sensibilisierung.

Die signifikant höchsten Serumlevel spezifischer IgEs und IgGs wurden ebenfalls bei nBet v 1a sensibilisierten Tieren gemessen. Interessanterweise erkannten hierbei die spezifischen IgG₁-Antikörper bei 7 von 7 getesteten Tieren sowie die IgG_{2a}²²-AK

²⁰ Die transgenen Tiere bilden einen für OVA spezifischen Rezeptor, welcher vom Major Histocompatibility Complex II (MHC II, I-A^d) CD⁴ positiver T-Zellen (T_H2) präsentiert wird (80% -90% der Thymus-T-Zellen transgener Tiere). Diese Tiere werden zur Beobachtung der CD⁴⁺-Zell-Differenzierung und Toleranzentwicklungen verwendet.

²¹ IgG₁: T_H2 -assoziiertes Immunglobulin, Isotypenswitch (Plasmazelle) durch T_H2 -Zytokin IL-4 gesteuert

²² IgG_{2a}: T_H1 -assoziiertes Immunglobulin, Isotypenswitch (Plasmazelle) durch T_H1 -Zytokin IFN- γ gesteuert

bei 3 von 7 Tieren nitriertes Ova (nOVA) als Antigen. Jedoch wurde keine Kreuzreaktivität bei IgE-Antikörpern gemessen. Dies unterstreicht den komplexen Einfluss der Nitrierung von Allergenen auf das allergische Geschehen.

Diese Ergebnisse zeigen anhand eines alternativen murinen Allergie-Modells unter Verwendung von BALB/c-Tieren, dass die allergischen Potentiale von OVA als auch von Bet v 1a durch Nitrierung deutlich gesteigert werden und Kreuzreaktionen möglich sind.

5.4.4 Versuche mit nitriertem Polytyrosin

Die exemplarischen Versuche an BALB/c-Mäusen mit nitriertem Polytyrosin (nPT) hoben sich nicht signifikant durch Zellzahl oder Zellpopulationen von der Kontrollgruppe PBS/PBS ab. Bei der nPT/nPT-Gruppe lag die durchschnittliche Zellzahl zwar auf dem Niveau der OVA/OVA-Gruppe, jedoch bildeten bei der nPT/nPT-Gruppe die Makrophagen den Großteil der eingewanderten Immunzellen (siehe auch Zytospinpräparate, Abs.4.3.1, Abbildung 29). Kaum waren eosinophile Granulozyten, noch seltener Lymphozyten zu finden. Der Proteingehalt der BAL lag etwas höher als der durchschnittliche Kontrollwert, jedoch niedriger als bei den Allergen-Versuchsgruppen. Hieraus konnte auf eine hauptsächlich unspezifische Immunabwehr geschlossen werden.

Die Histologie jedoch ließ bei diesen Gruppen, z.T. auf Lungenflügel oder Lobi begrenzte, Strukturdestruktion und perivasale sowie peribronchiale Zellsäume erkennen. Um dies zu erklären wäre die Messung des Schädigungsmarkers LDH in der BAL informativ gewesen und sollte bei zukünftigen Versuchen berücksichtigt werden.

Die Immunhistologie wies bei den nPT-Präparaten vor allem peribronchial einen deutlichen GR- und GPX3-Gehalt auf, mäßig ausgeprägte Banden waren in den Western Blots sichtbar. Die immunhistologische Detektion auf GPX4 fiel bei allen Vergleichspräparaten sehr schwach aus, lediglich bei der Gruppe nPT/nPT wurden geringe Färbungen beobachtet. Dies war im Hinblick auf die RT-qPCR Ergebnisse interessant, da auch bei der Gruppe nPT/nKLH reduzierte Expressionswerte für GR und GPX4 im Vergleich zur Kontrolle gemessen wurden. Die Gruppe nPT/nPT wies leicht über dem Kontrollniveau liegende Expressionswerte für GR, die GPX3, als auch die GPX4 auf. Diese Beobachtung müsste man in erneuten Versuchen mit größerer Fallzahl verifizieren, um weiterführende Schlüsse ziehen zu können.

Insgesamt zeigte die Behandlung mit nitriertem Polytyrosin einen geringeren

Akut-Effekt auf die BALB/c-Tiere, als die Behandlung mit nitrierten Allergenen. Es wurde keine allergiespezifische Entzündungsreaktion beobachtet. Die dritte Hypothese, nitriertes Polytyrosin könne bei BALB/c-Tieren eine akut-allergische Entzündungsreaktion hervorrufen, konnte durch diese exemplarischen Versuche nicht gestützt werden.

5.5 Fazit und Ausblick

In der Zusammenschau konnten die Ergebnisse dieser Studie mit C57BL6- und BALB/c-Tieren bestätigen, dass die Nitrierung von Allergenen deren allergisches Entzündungspotential erhöht (1. Hypothese). Eine Kreuzreaktivität nach Behandlung mit unverwandten nitrierten Allergenen erscheint möglich und erfordert weitere Untersuchungen (2. Hypothese). Im akuten Asthmaschema zeigte sich das antioxidative Glutathionsystem der Typ-II-Pneumozyten verschiedener Versuchsgruppen vielfach posttranslational aktiviert, während die Genexpression zumeist tendenziell down-reguliert war. Dies bestätigt den komplexen Einfluss der nitrierten Substanzen auf den Antioxidationshaushalt der Typ-II-Zellen.

Die Behandlung einer begrenzten Anzahl an BALB/c-Tieren mit nitriertem Polytyrosin führte zu einer leichten Immunstimulation, auch waren histologische Veränderungen vereinzelt erkennbar. Eine charakteristische allergische Akut-Reaktion konnte jedoch im Rahmen dieser Versuche nicht beobachtet werden (3.Hypothese).

Im kritischen Rückblick wurde deutlich, dass eine begrenztere Auswahl an Versuchsgruppen mit jeweils größerer Tierzahl die Ergebnisqualität noch verbessert hätte. Die Bestimmung der Serumparmeter IgE, IgG₁ und IgG_{2a} wäre sinnvoll gewesen und hätten den Vergleich mit ähnlichen Studien (Gruijthuijsen YK, 2006; Bevelander M, 2007) vereinfacht.

Jedoch ist diese Arbeit eine richtungsweisende Grundlage für aufbauende Projekte. Eine gezielte Überprüfung der Kreuzreaktivitätshypothese bei optimierter Versuchstrategie wäre ein interessanter Ansatz für folgende Studien. Insbesondere können beteiligte Immunglobuline, Zytokine und Chemokine auf ihre Rolle bei der Entzündungs- und Kreuzreaktion untersucht werden. Einen weiteren Forschungsansatz stellt die Behandlung mit gestaffelten Nitrierungsgraden dar.

In jedem Fall wird ein tieferes Verständnis der mit Proteinnitrierung assoziierten Allergie- und Asthmagefahr sowohl die Entwicklung wirkungsvoller Therapien für Patienten als auch die Einführung effektiver Präventionsmaßnahmen für Mensch und Umwelt erleichtern.

6 Zusammenfassung

In den letzten Dekaden ist die Inzidenz allergischer Erkrankungen, wie dem Asthma bronchiale, vor allem in Industrienationen rapide angestiegen. Bei dieser chronischen Entzündung und Hyperreagibilität der Atemwege ist die Frühreaktion durch die IgE vermittelte Immunzellaktivierung und Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren charakterisiert. Sie imponiert klinisch als akute Bronchialobstruktion, bedingt durch rapides Anschwellen der Schleimhaut mit Schleimabsonderung und Kontraktion der glatten Muskulatur. Die Spätreaktion (2-24 h nach Beginn) wird durch die Aktivierung migrierter Leukozyten, insbesondere eosinophiler Granulozyten und eine erneute Welle proinflammatorischer und bronchokonstriktorischer Mediatoren verursacht. Verschiedene Risiken werden bei der multifaktoriellen Genese des Asthmas diskutiert. Die dabei bestehenden geographischen Inzidenzdiskrepanzen lassen auf einen Zusammenhang zwischen genetischen Gesellschaftsmustern und Umweltfaktoren schließen, den „Gene-environmental-Interactions“.

In der vorliegenden Arbeit wurden Auswirkungen verkehrsbedingter Abgasbelastung behandelt (Stichwort: Umwelthypothese). Der negative Einfluss oxidativen und nitrosativen Stresses auf die Aggravation oder Genese einer allergischen Atemwegserkrankung wurde bereits in zahlreichen epidemiologischen und tierexperimentellen Studien aufgezeigt. In den letzten Jahren erregte die Formation von Nitrotyrosin-Resten an Proteinen wissenschaftliches Interesse, da dieser Vorgang mit zahlreichen Organerkrankungen assoziiert wird. Sinkt das Redoxpotential der Atemwege im Verhältnis zur Belastung durch oxidative- und nitrosative Spezies, kann die hohe Rate der Nitrierungen zu Fehlfunktionen der Proteine/Enzyme führen. Bei Patienten mit entzündlichen Atemwegserkrankungen konnten ein konstant erhöhtes oxidatives Stresslevel sowie eine erhöhte Anzahl an Nitrotyrosin-Formationen im Respirationstrakt gemessen werden. Zudem kommt es in der Luft verkehrsreicher Gebiete bei hohen Ozon- und Stickstoffdioxidkonzentrationen zu effektiven Nitrierungen von Proteinen und Allergen, welche inhaliert werden und extrinsisch-asthmatische Reaktionen der Atemwege verschärfen oder hervorgerufen können.

Das Versuchsschema sah vor, Tiere des C57BL6- (n=228) und BALB/c-Stammes (n=54) im akuten Asthmodell mit nitrierten und nicht nitrierten Allergenen (Ovalbumin (OVA bzw. nOVA) und Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH bzw. nKLH)) zu behandeln. Drei zentrale Hypothesen wurden aufgestellt:

1. Die Nitrierung von Allergenen potenziert ihre akut-entzündliche Wirkung auf die Atemwege.

2. Nach Sensibilisierung auf ein bestimmtes nitriertes Allergen, reagieren Individuen auch gegen ein anderes nitriertes Allergen, sodass es zu Kreuzreaktionen kommt.
3. Die Behandlung von BALB/c-Tieren mit der nitrierten Aminosäure Polytyrosin (nPT) führt zu einer allergisch-entzündlichen Reaktion.

Zur Klärung der Hypothesen wurden den jeweils vierwöchigen Sensibilisierungs- und Provokationsschemata verschiedene Untersuchungen angeschlossen (Versuchszeitraum: 2008 - 2011). Besonders aufschlussreich verliefen hierbei die Untersuchung der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (Zellzahl, Zellpopulation, Proteingehalt) sowie die Analysen der histologischen Lungenpräparate. Die strukturellen und zellulären Veränderungen ließen insbesondere bei den Versuchsgruppen nOVA/nOVA, nKLH/nKLH und auch bei nOVA/nKLH-Tieren des C57BL6- und BALB/c-Stammes allergisch-entzündliche Reaktionen erkennen. Weiterhin wurden Typ-II-Pneumozyten aus den Lungen gewonnen, um daraus Proteine und RNA zu isolieren. Zentrale Enzyme des antioxidativen Glutathionsystems (Glutathionreduktase, Glutathionperoxidase 3 und 4) konnten daraufhin sowohl in der Immunhistologie als auch bei den Western-Blots mit Typ-II-Zell-Proteinen detektiert werden. Die Versuchsgruppen zeigten gegenüber den Kontrollen zumeist Steigerungen der Enzymaktivitäten, welche sich in repräsentativen Bildern veranschaulichen ließen. Die RT-qPCR ermöglichte einen Einblick in die Expression der Enzyme. Auf dieser Ebene beobachtete man bei vielfach eine reaktive Down-Regulation im Vergleich zu den Kontrollen.

Anhand aller Ergebnisse konnte eine Verstärkung des allergischen Potentials durch Nitrierung (erste Hypothese) erstmals in vivo bestätigt werden. Nach Behandlung mit nitrierten Allergenen zeigten die Versuchstiere eine aggravierte allergisch-entzündliche pulmonale Reaktion, verglichen mit unveränderten Allergenen. Die zweite Hypothese (Kreuzreaktivität) konnte teilweise unterstützt werden, jedoch sind hierfür gezieltere Untersuchungen notwendig. Die dritte Hypothese konnte nicht gestützt werden: Bei den exemplarischen Versuchen mit nPT an BALB/c-Tieren ließen sich keine typisch allergischen Entzündungsreaktionen nachweisen. Für eine bessere Beurteilung der durch Nitrierung geförderten Kreuzreaktivität sind zukünftig Versuche in größerer Tierzahl, sowie die Messung bestimmter Serumparameter sinnvoll. Gesteigerte allergische Immunreaktionen und Kreuzreaktivitäten nach Behandlung mit nitrierten Allergenen wurden bisher nur bei murinen Milzzellen festgestellt. Insofern bilden diese Untersuchungen eine interessante Grundlage für weitere Forschungsprojekte, welche anhand der gesammelten Erfahrungen in ihrem Ablauf optimiert werden können.

7 Summary

Within the last decades a rapid increase of allergic diseases such as bronchial asthma was reported, especially concerning the industrialized countries. The acute response of this chronic inflammatory disease with its hyperreactivity of the bronchial tract is characterized by activation of immunocompetent cells and their release of proinflammatory mediators, triggered by IgE. This process induces the clinical hallmarks of allergic asthma, such as acute airway obstruction, due to swelling of the bronchial mucosa, excessive secretion of mucus into the airways and contraction of smooth muscles. The late-phase response (2-24 h after the original reaction) is caused by activation of migrated leucocytes, especially eosinophils and an anew surge of inflammatory and bronchoconstrictive mediators. Large numbers of risk factors are discussed, as asthma is a multifactorial disease. Geographic distinctions of its incidence lead up to the conclusion there must be a correlation between the genetic background of a population and its environmental conditions, called „Gene-environmental-Interactions“.

The present thesis deals with negative impacts on pulmonary health caused by traffic exhausts (keyword: Environmental factors). Various epidemiological and experimental studies revealed the damaging influence due to oxidative and nitrosative stress, in relation to aggravation or triggering of an allergic respiratory reaction. During the last years the formation of nitrotyrosine residues attached to proteins aroused special scientific attention, as this process is associated with numerous organic diseases. Exposure to oxidative and nitrosative species can decrease the redox potential of the airways severely. Subsequently a high rate of nitration in proteins/enzymes can induce dysfunctions. Patients suffering from inflammatory airway diseases showed to have a constantly elevated level of nitrotyrosine residues in their respiratory tract. Moreover it was demonstrated that high concentrations of ozone and nitrogen dioxide in congested areas effectively generate nitrated proteins/allergens that are inhaled and may exacerbate or trigger extrinsic-asthmatic reactions of the airways.

For this study C57BL6- (n=228) and BALB/c-mice (n=54) were treated with nitrated and unmodified allergens (Ovalbumin (OVA, resp. nOVA) and keyhole limpet hemocyanin (KLH, resp. nKLH)) in a model of acute asthma.

Three central hypotheses were postulated:

1. Nitration of allergens enhances their acute-inflammatory impact on the respiratory tract.

2. After sensitization against one specific nitrated allergen, other nitrated allergens induce similar allergic reactions in an individual, so that cross-reactions occur.
3. Treatment of BALB/c-mice with the nitrated amino acid polytyrosine arouses an allergic inflammatory reaction.

After having the mice sensitized and provoked according to schedules for four weeks, various tests were performed to examine those hypotheses (timeframe: 2008 – 2011). Examinations on the bronchoalveolar lavage fluid (cell count, cell populations and concentration of proteins) and the histology showed to be most instructive. In particular the tested groups nOVA/nOVA, nKLH/nKLH and nOVA/nKLH, carried out with C57BL6- and BALB/c-mice, displayed cellular and structural changes due to inflammatory allergic reactions. Furthermore, type-II-pneumocytes were isolated from the lungs to extract proteins and RNA. Consequently central enzymes of the glutathione-system (glutathion reductase, glutathion peroxidase 3 and 4) were detected by immune-histochemical methods and by western blots using type-II-cell protein samples. In contrast to the controls, most of the tested groups showed an imposing increase in enzyme activity, exemplified in representative pictures. RT-qPCR gave an insight into DNA-expression of the named enzymes. As compared to the controls many of the tested groups displayed a reactive down-regulation on this level. All findings taken together, an aggravation of the allergic potential through nitration (first Hypothesis) was confirmed and examined in vivo for the first time. Treatment with nitrated allergens induced an intensified allergic inflammation of the airways, compared to treatment with unmodified allergens. The second Hypothesis (regarding cross reactions) was supported to some extent, yet more aimed investigations are required in future works. The third Hypothesis, involving nitrated polytyrosine, could not be verified by these exemplary tests on BALB/c-mice, as no characteristic signs of an allergic inflammation were detected.

To get a better insight into cross reactions promoted through nitration, following studies should include a larger number of mice, as well as certain immunologic parameters in the serum should be determined.

Heretofore, allergic immunostimulation and cross reactions after treatments with nitrated allergens were observed only in murine spleen cells. In this respect the present study provides an interesting basis for future projects and due to all gained experiences their realization will be optimized.

8 Literaturverzeichnis

Agrawal A, Singh SK, Singh VP, Murphy E, Parikh I., 2008. Partitioning of nasal and pulmonary resistance changes during noninvasive plethysmography in mice. *J Appl Physiol.*, 105: 1975-9.

Ahrén C, Jungersten L, Sandberg T., 1999. Plasma nitrate as an index of nitric oxide formation in patients with acute infectious diseases. *Scand J Infect Dis.*, 31: 405-7.

Al-Afaleg NO, Al-Senaïdy A, El-Ansary A., 2011. Oxidative stress and antioxidant status in Saudi asthmatic patients. *Clin Biochem.*, 44: 612-7.

Anderson JT, Zeng M, Li Q, Stapley R, Moore DR 2nd, Chenna B, Fineberg N, Zmijewski J, Eltoum IE, Siegal GP, Gaggar A, Barnes S, Velu SE, Thannickal VJ, Abraham E, Patel RP, Lancaster JR Jr, Chaplin DD, Dransfield MT, Deshane JS., 2011. Elevated levels of NO are localized to distal airways in asthma. *Free Radic Biol Med.*, 50: 1679-88.

AWMF, KBV, BÄK., 2011. NVL Asthma, Nationale Versorgungsleitlinien für Asthma. 2. Auflage, Version 1.3.

Balmes JR, Earnest G, Katz PP et al., 2009. Exposure to traffic: Lung function and health status in adults with asthma. *J Allergy Clin Immunol.*, 123: 626–631.

Barth PJ, Müller B, Wagner U, Bittinger A., 1995. Quantitative analysis of parenchymal and vascular alterations in NO₂-induced lung injury in rats. *Eur Respir J.*, 8: 1115-21.

Bates JH, Irvin CG., 2003. Measuring lung function in mice: the phenotyping uncertainty principle. *J Appl Physiol.*, 94: 1297-306.

Bevelander M, Mayette J, Whittaker LA, Paveglio SA, Jones CC, Robbins J, Hemenway D, Akira S, Uematsu S, Poynter ME., 2007. Nitrogen dioxide promotes allergic sensitization to inhaled antigen. *J Immunol.*, 179: 3680-8.

Boulet LP, Sterk PJ., 2007. Airway remodeling: The future, *Eur Respir J.*, 30, S. 831–834.

Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM., 2000. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med.*, 161: 1720-45.

Bråbäck L, Forsberg B., 2009. Does traffic exhaust contribute to the development of asthma and allergic sensitization in children: Findings from recent cohort studies. *Environ Health.*, 8: 17.

Brauer M, Hoek G, Smit HA, de Jongste JC, Gerritsen J, Postma DS, Kerkhof M, Brunekreef B., 2007. Air pollution and development of asthma, allergy and infections in a birth cohort. *Eur Respir J.*, 29: 879–888.

Breen AP, Murphy JA., 1995. Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic Biol.*, 18: 1033-77.

Busse WW, Lemanske RF Jr., 2001. Asthma. *N Engl J Med.*, 344: 350-62.

Carroll N, Cooke C, James A., 1997. The distribution of eosinophils and lymphocytes in the large and small airways of asthmatics. *Eur Respir J.*, 10: 292-300.

Celio S, Troxler H, Durka SS, Chládek J, Wildhaber JH, Sennhauser FH, Heizmann CW, Moeller A., 2006. Free 3-nitrotyrosine in exhaled breath condensates of children fails as marker for oxidative stress in stable fibrosis and asthma. *Nitric Oxide*, 15: 226-32.

Chen J, Chen Z, Narasaraaju T, Jin N, Liu L., 2004. Isolation of highly pure alveolar epithelial type I and type II cells from rat lungs. *Laboratory Investigation*, 84: 727–735.

Chiba Y, Yanagisawa R, Sagai M., 1995. Strain and route differences in airway responsiveness to acetylcholine in mice. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, 90: 169-72.

Cohn L, Elias JA, Chupp GL., 2004. Asthma: Mechanisms of disease persistence and progression. *Annu Rev Immunol*, 22: 789-815.

Corti M, Brody AR, Harrison JH., 1996. Isolation and primary culture of murine alveolar type II cells. *Am.J respir Cell Mol Biol.*, 14: 309-15.

Tsikas D., 2005. Methods of quantitative analysis of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in human biological fluids. *Free Radic Res.*, 39: 797-815.

De Andrade JA, Crow JP, Vierea L, Alexander B, Young R, Mc Griffin DC, Zorn GL, Zhu S, Malaton K, Jackson RM., 2000. Protein Nitration, Metabolites of Reactive Nitrogen Species and Inflammation in Lung Allografts. *Am J Crit Care Med*, 161: 2035-2042.

- De Sanctis GT, Daheshia M, Daser A., 2001.** Genetics of airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol.*, 108: 11-20.
- Dittrich AM, Meyer HA, Krokowski M, Quarcoo D, Ahrens B, Kube SM, Witzentrath M, Esworthy RS, Chu FF, Hamelmann E., 2010.** Glutathione peroxidase-2 protects from allergen-induced airway inflammation in mice. *Eur Respir J.*, 35: 1148-54.
- Dobbs LG, Gonzalez R, Williams MC., 1986.** An improved method for isolating type II cells in high yield and purity. *Am Rev Respir Dis.*, 134: 141-5.
- Drazen JM, Finn PW, De Sanctis GT., 1999.** Mouse models of airway responsiveness: physiological basis of observed outcomes and analysis of selected examples using these outcome indicators. *Annu Rev Physiol.*, 61: 593-625.
- Drazen JM, Takebayashi T, Long NC, De Sanctis GT, Shore SA., 1999.** Animal models of asthma and chronic bronchitis. *Clin Exp Allergy.*, 29: 37-47.
- Eder W, Ege MJ, von Mutius E., 2006.** The asthma epidemic. *N Engl J Med.*, 355: 2226–2235.
- Escamilla-Nunez MC, Barraza-Villarreal A, Hernandez-Cadena L, et al., 2008.** Traffic-related air pollution and respiratory symptoms among asthmatic children, resident in Mexico City: The EVA cohort study. *Respir Res.*, 9: 74.
- Evans MJ, Cabral LJ, Stephens RJ, Freeman G., 1975.** Transformation of alveolar type 2 cells to type 1 cells following exposure to NO₂. *Exp Mol Pathol.*, 22: 142-150.
- Fechter LD, Nelson-Miller A, Gearhart C., 2008.** Depletion of liver glutathione levels in rats: a potential confound of nose-only inhalation. *Inhal Toxicol.*, 20: 885-90.
- Fehrenbach A, Wegmann M, Heimann S, Fehrenbach H, Renz H, Garn H, Herz U., 2005.** NO₂-induced airway inflammation is associated with progressive airflow limitation and development of emphysema-like lesions in C57BL/6 mice. *Exp Toxicol Pathol*, 56: 341-50.
- Fitzpatrick AM, Brown LA, Holguin F, Teague WG., 2009.** Levels of nitric oxide oxidation products are increased in the epithelial lining fluid of children with persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol.*, 124: 990-6.

Fitzpatrick AM, Brown LA, Holguin F, Teague WG und National Institutes of Health/National Heart, Lung, and Blood Institute Severe Asthma Research Program., 2009. Levels of nitric oxide oxidation products are increased in the epithelial lining fluid of children with persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol.*, 124: 990-6.

Folkerts G, Kloek J, Muijsers RB, Nijkamp FP., 2001. Reactive nitrogen and oxygen species in airway inflammation. *Eur J Pharmacol.*, 429: 251-62.

Forbes LJ, Kapetanakis V, Rudnicka AR, Cook DG, Bush T, Stedman JR, Whincup PH, Strachan DP, Anderson HR., 2009. Chronic exposure to outdoor air pollution and lung function in adults. *Thorax.*, 64: 657-63.

Forman HJ, Fukuto JM, Torres M., 2004. Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 287: 246-56.

Franze T, Weller MG, Niessner R, Pöschl U., 2005. Protein nitration by polluted air. *Environ Sci Technol*, 15: 1673-8.

Garn H, Siese A, Stumpf S, Wensing A, Renz H, Gerns D., 2006. Phenotypical and functional characterization of alveolar macrophage subpopulations in the lungs of NO₂-exposed rats. *Respir Res.*, 7: 4.

Gauderman WJ, Avol E, Gilliland F, Vora H, Thomas D, Berhane K, McConnell R, Kuenzli N, Lurmann F, Rappaport E, Margolis H, Bates D, Peters J., 2004. The effect of air pollution on lung development from 10 to 18 years of age. *N Engl J Med.*, 351: 1057-67.

Gauderman WJ, Avol E, Lurmann F, Kuenzli N, Gilliland F, Peters J, McConnell R., 2005. Childhood asthma and exposure to traffic and nitrogen dioxide. *Epidemiology.*, 16: 737-43.

Gent JF, Triche EW, Holford TR et al., 2003. Association of low-level ozone and fine particles with respiratory symptoms in children with asthma. *JAMA.*, 290: 1859–1867.

Ghosh S, Erzurum SC., 2011. Nitric oxide metabolism in asthma pathophysiology. *Biochim Biophys Acta*, 18: 1008-16.

Global initiative for asthma (GINA), 2008, Global strategy for asthma management and prevention.

Glaab T, Ziegert M, Baelder R, Korolewitz R, Braun A, Hohlfeld JM, Mitzner W, Krug N, Hoymann HG., 2005. Invasive versus noninvasive measurement of allergic and cholinergic airway responsiveness in mice. *Respir Res.*, 6: 139.

Greenacre SA, Ischiropoulos H., 2001. Tyrosine nitration: localisation, quantification, consequences for protein function and signal transduction. *Free Radic Res.*, 34: 541-81.

Gruijthuijsen YK, Grieshuber I, Stöcklinger A, Tischler U, Fehrenbach T, Weller MG, Vogel L, Vieths S, Pöschl U, Duschl A., 2006. Nitration enhances the allergenic potential of proteins. *Int Arch Allergy Immunol.*, 141: 265-75.

Gueders MM, Paulissen G, Crahay C, Quesada-Calvo F, Hacha J, Van Hove C, Tournoy K, Louis R, Foidart JM, Noël A, Cataldo DD., 2009. Mouse models of asthma: a comparison between C57BL6 and BALB/c strains regarding bronchial responsiveness, inflammation, and cytokine production. *Inflamm Res.*, 58: 845-54.

Hamelmann E, Schwarze J, Takeda K, Oshiba A, Larsen GL, Irvin CG, Gelfand EW., 1997. Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am J Respir Crit Care Med.*, 156: 766-75.

Hamid Q, Tulic M., 2009. Immunobiology of asthma. *Annu Rev Physiol.*, 71: 489-507.

Hayashi Y, Kohno T, Ohwada H., 1987. Morphological effects of nitrogen dioxide on the rat lung. *Environ Health Perspect.*, 73: 135-45.

Ho SM., 2011. Environmental epigenetics of asthma: An update. *J Allergy Clin Immunol.*, 126: 453-65.

Hodgkins SR, Ather JL, Paveglio SA, Allard JL, LeClair LA, Suratt BT, Boyson JE, Poynter ME., 2010. NO₂ inhalation induces maturation of pulmonary CD11c⁺ cells that promote antigenspecific CD4⁺ T cell polarization. *Respir Res.*, 11: 102.

Hunter DD, Wu Z, Dey RD., 2010. Sensory neural responses to ozone exposure during early postnatal development in rat airways. *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 43: 750-7.

ISAAC, The International Study of Asthma and Allergies in Childhood Steering Committee, 1998. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. *Lancet*, 351: 1225–1232.

Johnson CC, Ownby DR, Alford SH, Havstad SL, Williams LK, Zoratti EM, Peterson EL, Joseph CL., 2005. Antibiotic exposure in early infancy and risk for childhood atopy. *J Allergy Clin Immunol.*,115: 1218-24.

Just J, Ségala C, Sahraoui F, Priol G, Grimfeld A, Neukirch F., 2002. Short-term health effects of particulate and photochemical air pollution in asthmatic children. *Eur Respir J.*, 20: 899–906.

Kabesch M., 2010. Genetik bei Atopie und und Asthma bronchiale- Relevanz für die Praxis. *Pädiatrische Allergologie*: 13.

Kaminsky DA, Mitchell J, Carroll N, James A, Soultanakis R, Janssen Y., 1999. Nitrotyrosine formation in the airways and lung parenchyma of patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol.*, 104: 747-54.

Karol MH., 1994. Animal models of occupational asthma. *Eur Respir*, 7: 555–68.

Kawakami M, Yasui S, Yamawaki I, Katayama M, Nagai A, Takizawa T., 1989. Structural changes in airways of rats exposed to nitrogen dioxide intermittently for seven days. Comparison between major bronchi and terminal bronchioles. *Am Rev Respir Dis.*, 140: 1754-62.

Kelly FJ., 2003. Oxidative stress: Its role in air pollution and adverse health effects. *Occup Environ Med.*, 60: 612-6.

Kenyon NJ, Ward RW, Last JA., 2003. Airway fibrosis in a mouse model of airway inflammation. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 186: 90-100.

Kierstein S, Krytska K, Sharma S, Amrani Y, Salmon M, Panettieri RA Jr, Zangrilli J, Haczku A., 2008. Ozone inhalation induces exacerbation of eosinophilic airway inflammation and hyperresponsiveness in allergen-sensitized mice. *Allergy.*, 63: 438-46.

Kips JC, Anderson GP, Fredberg JJ, Herz U, Inman MD, Jordana M, Kemeny DM, Lötval J, Pauwels RA, Plopper CG, Schmidt D, Sterk PJ, Van Oosterhout AJ, Vargaftig BB, Chung KF., 2003. Murine models of asthma. *Eur Respir J.*, 22: 374-82.

Knapp S, Leemans JC, Florquin S, Branger J, Maris NA, Pater J, van Rooijen N, van der Poll T., 2003. Alveolar macrophages have a protective antiinflammatory role during murine pneumococcal pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.*, 167: 171-9.

Koenig QJ., 1999. Air pollution and asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 104: 717-722.

Koike Y, Hisada T, Utsugi M, Ishizuka T, Shimizu Y, Ono A, Murata Y, Hamuro J, Mori M, Dobashi K., 2007. Glutathione redox regulates airway hyperresponsiveness and airway inflammation in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 37: 322-9.

Krzyzanowski M, Kuna-Dibbert B, Schneider J., 2005. Health effects of transport-related air pollution. WHO Regional Office For Europe.: 190, 205.

Lancaster JR., 2006. Nitroxidative, nitrosative, and nitrative stress: kinetic predictions of reactive nitrogen species chemistry under biological conditions. *Chem Res Toxicol.*, 19: 1160-74.

Lin S, Liu X, Le LH, Hwang SA., 2008. Chronic exposure to ambient ozone and asthma hospital admissions among children. *Environ Health Perspect.*, 116: 1725–1730.

Livak, Kenneth J., Schmittgen, Thomas D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ Method. *METHODS.*: 402–408.

MacPherson JC, Comhair SA, Erzurum SC, Klein DF, Lipscomb MF, Kavuru MS, Samoszuk MK, Hazen SL., 2001. Eosinophils are a major source of nitric oxide-derived oxidants in severe asthma: Characterization of pathways available to eosinophils for generating reactive nitrogen species. *J Immunol.*, 166: 5763-72.

Mangialasche F, Polidori MC, Monastero R, Ercolani S, Camarda C, Cecchetti R, Mecocci P., 2009. Biomarkers of oxidative and nitrosative damage in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Ageing Res Rev.*, 8: 285-305.

Martin RJ., 2002. Therapeutic significance of distal airway inflammation in asthma. *J Allergy Clin Immunol.*, 109: 447-60.

Matthew M, Denise F, Shaun H, Richard B., 2004. Global Burden of Asthma. Medical Research Institute of New Zealand: 9.

McCreanor J, Cullinan P, Nieuwenhuijsen MJ et al., 2007. Respiratory effects of exposure to diesel traffic in persons with asthma. *N Engl J Med.*, 357: 2348–2358.

Melgert BN, Postma DS, Geerlings M, Luinge MA, Klok PA, van der Strate BW, Kerstjens HA, Timens W, Hylkema MN., 2004. Short-term smoke exposure attenuates ovalbumin-induced airway inflammation in allergic mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 30: 880-5.

Meng YY, Rull RP, Wilhelm M, Lombardi C, Balmes J, Ritz B., 2010. Outdoor air pollution and uncontrolled asthma in the San Joaquin Valley, California. *J Epidemiol Community Health.*, 64: 142–147.

Misaka S, Sato H, Aoki Y, Mizumoto T, Onoue S, Yamada S., 2011. Novel vasoactive intestinal peptide derivatives with improved stability protect rat alveolar L2 cells from cigarette smoke-induced cytotoxicity and apoptosis. *Peptides.*, 32: 401-7.

Morgenstern V, Zutavern A, Cyrus J, Brockow I, Koletzko S, Kramer U, Behrendt H, Herbarth O, von Berg A, Bauer CP, Wichmann HE, Heinrich J., 2008. Atopic diseases, allergic sensitization, and exposure to traffic-related air pollution in children. *Am J Respir Crit Care Med.*, 177: 1331-7.

Müller B, Garn H, Hochscheid R., 2003. Impaired recycling of surfactant-like liposomes in type II pneumocytes from injured lungs. *Thorax.*, 58: 127-34.

Müller B, Seifart C, von Wichert P, Barth PJ., 1998. Adaptation of rat type II pneumocytes to NO₂: effects of NO₂ application mode on phosphatidylcholine metabolism. *Am J Respir Cell Mol.*, 18: 712-20.

Müller B, von Wichert P., 1993. Effect of nitrogen dioxide inhalation on surfactant phosphatidylcholine synthesis in rat alveolar type II cells. *Biochim Biophys Acta.*, 1170: 38-43 .

Nakaji H, Matsumoto H, Niimi A, Handa T, Ito I, Kanai M, Tabata H, Sakai H, Kobashi Y, Mochizuki Y, Chin K, Mishima M., 2011. Eosinophils and macrophages are involved in nitrosative stress in chronic eosinophilic pneumonia. *Nitric Oxide.*, 24: 173-5.

National Asthma Education and Prevention Program: Expert panel report III: Guidelines for the diagnosis and management of asthma, 2007. Bethesda, MD: National Heart, Lung, and Blood Institute, 2007. (NIH publication nr. 08-4051).

National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI)., 2008. Global strategy for asthma management and prevention (by the Global Initiative for Asthma). Bethesda (MD).

Neuhaus-Steinmetz U, Glaab T, Daser A, Braun A, Lommatzsch M, Herz U, Kips J, Alarie Y, Renz H., 2000. Sequential development of airway hyperresponsiveness and acute airway obstruction in a mouse model of allergic inflammation. *Int Arch Allergy Immunol.*, 121: 57-67.

Nordling E, Berglind N, Melen E, Emenius G, Hallberg J, Nyberg F, Pershagen G, Svartengren M, Wickman M, Bellander T., 2008. Traffic-related air pollution and childhood respiratory symptoms, function and allergies. *Epidemiology.*, 19: 401–408.

Olker C, Siese A, Stumpf S, Müller B, Gerns D, Garn H., 2004. Impaired superoxide radical production by bronchoalveolar lavage cells from NO(2)-exposed rats. *Free Radic Biol Med.*, 37: 977-8.

Parfentjev IA, Goodline MA., 1948. Histamine shock in mice sensitized with Hemophilus pertussis vaccine. *J Pharmacol Exp Ther.*, 92: 411-3.

Pauluhn J, Hai CX., 2011. Attempts to counteract phosgene-induced acute lung injury by instant high-dose aerosol exposure to hexamethylenetetramine, cysteine or glutathione. *Inhal Toxicol.*, 23: 58-64.

Perišić T, Srećković M, Matić G., 2007. An imbalance in antioxidant enzymes and stress proteins in childhood asthma. *Clin Biochem.*, 40: 1168-71.

Poynter ME, Persinger RL, Irvin CG, Butnor KJ, van Hirtum H, Blay W, Heintz NH, Robbins J, Hemenway D, Taatjes DJ, Janssen-Heininger Y., 2006. Nitrogen dioxide enhances allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in the mouse. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*, 290: 144-52.

Poynter ME, Persinger RL, Irvin CG, Butnor KJ, van Hirtum H, Blay W, Heintz NH, Robbins J, Hemenway D, Taatjes DJ, Janssen-Heininger Y. Rahman I., 2011. Pharmacological antioxidant strategies as therapeutic interventions for COPD. *Biochim Biophys Acta.*, Epub ahead of print.

Rahman I., 2005. Regulation of glutathione in inflammation and chronic lung diseases. *Mut. Res.*, 579: 58-80.

Reader JR, Tepper JS, Schelegle ES, Aldrich MC, Putney LF, Pfeiffer JW, Hyde DM., 2003. Pathogenesis of mucous cell metaplasia in a murine asthma model. *Am J Pathol.*, 162: 2069-78.

Reed CE., 1968. Pertussis sensitization as an animal model for the abnormal bronchial sensitivity of asthma. *Yale J Biol Med.*, 40: 507-21.

Ricciardolo FL, Di Stefano A, Sabatini F, Folkerts G., 2006. Reactive nitrogen species in the respiratory tract. *Eur J Pharmacol.*, 533: 240-52.

Ridnour LA, Thomas DD, Mancardi D, Espey MG, Miranda KM, Paolocci N, Feelisch M, Fukuto J, Wink DA., 2004. The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations. *Biol Chem.*, 385: 1-10.

Robinson DR et al., 1992. Predominant Th2-like bronchoalveolar T lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med.*, 326: 298–304.

Rogers A, Bunyavanich S., 2011. Unravelling gene-by-environment effects in asthma and allergy: The glutathione pathway as an early success story. *Clin Exp Allergy.*, 41: 1502-4.

Saxon A, Diaz-Sanchez D., 2005. Air pollution and allergy: you are what you breathe. *Nat Immunol.*, 6: 223–226 .

Sharma S, Poon A, Himes BE, Lasky-Su J, Sordillo JE, Belanger K, Milton DK, Bracken MB, Triche EW, Leaderer BP, Gold DR, Litonjua AA., 2011. Association of variants in innate immune genes with asthma and eczema. *Pediatr Allergy Immunol.*, Epub ahead of print.

Shi YH, Shi GC, Wan HY, Jiang LH, Ai XY, Zhu HX, Tang W, Ma JY, Jin XY, Zhang BY., 2011. Coexistence of Th1/Th2 and Th17/Treg imbalances in patients with allergic asthma. *Chin Med J (Engl)*, 124: 1951-1956.

Strand V, Svartengren M, Rak S, Barck C, Bylin G., 1998. Repeated exposure to an ambient level of NO₂ enhances asthmatic response to a nonsymptomatic allergen dose. *Eur Respir J.*, 12: 6-12.

Subbarao P, Mandhane PJ, Sears MR., 2009. Asthma: Epidemiology, etiology and risk factors. *CMAJ*, 18: E181-90.

Sugiura H, Ichinose M., 2011. Nitrate stress in inflammatory lung diseases. *Nitric Oxide*, 25: 138-144.

Takeda K, Haczku A, Lee JJ, Irvin CG, Gelfand EW., 2001. Strain dependence of airway hyperresponsiveness reflects differences in eosinophil localization in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*, 281: 394-402.

Taube C, Duez C, Cui ZH, Takeda K, Rha YH, Park JW, Balhorn A, Donaldson DD, Dakhama A, Gelfand EW., 2002. The role of IL-13 in established allergic airway disease. *J Immunol.*, 169: 6482-9.

Thornton CA, Macfarlane TV, Holt PG., 2010. The hygiene hypothesis revisited: Role of materno-fetal interactions. *Curr Allergy Asthma Rep.*, 10: 444-452.

Tsikas D, Mitschke A, Gutzki FM, Engeli S, Jordan J., 2010. Evidence by gas chromatography-mass spectrometry of ex vivo nitrite and nitrate formation from air nitrogen oxides in human plasma, serum, and urine samples. *Anal Biochem.*, 397: 126-8.

Tulic MK, Christodoulouopoulos P, Hamid Q., 2001. Small airway inflammation in asthma. *Respir Res.*, 2: 333-9.

Van Hove CL, Maes T, Cataldo DD, Guéders MM, Palmans E, Joos GF, Tournoy KG., 2009. Comparison of acute inflammatory and chronic structural asthma-like responses between C57BL/6 and BALB/c mice. *Int Arch Allergy Immunol.*, 149: 195-207.

Vargaftig BB, Singer M., 2003. Leukotrienes mediate murine bronchopulmonary hyperreactivity, inflammation, and part of mucosal metaplasia and tissue injury induced by recombinant murine interleukin-13. *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 28: 410-9.

Wegmann M, Fehrenbach H, Fehrenbach A, Held T, Schramm C, Garn H, Renz H., 2005. Involvement of distal airways in a chronic model of experimental asthma. *Clin Exp Allergy.*, 35: 1263-71.

White AC, Maloney EK, Boustani MR, Hassoun PM, Fanburg BL., 1995. Nitric oxide increases cellular glutathione levels in rat lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 13: 442-8.

Wikstrom ME, Stumbles PA., 2007. Mouse respiratory tract dendritic cell subsets and the immunological fate of inhaled antigens. *Immunol Cell Biol.*, 85:182-8.

Yamamoto M, Tochino Y, Chibana K, Trudeau JB, Holguin F, Wenzel SE., 2011. Nitric oxide and related enzymes in asthma: Relation to severity, enzyme function and inflammation. *Clin Exp Allergy.*, Epub ahead of print.

Yanagisawa R, Takano H, Inoue KI, Ichinose T, Sadakane K, Yoshino S, Yamaki K, Yoshikawa T, Hayakawa K., 2006. Components of diesel exhaust particles differentially affect Th1/Th2 response in a murine model of allergic airway inflammation. Clin Exp Allergy, 36: 386-95.

Yang H, Zhang Y, Pöschl U., 2010. Quantification of nitrotyrosine in nitrated proteins. Anal Bioanal Chem., 397: 879-86.

Zhang JJ, McCreanor JE, Cullinan P et al., 2009. Health effects of real-world exposure to diesel exhaust in persons with asthma. Res Rep Health Eff Inst., 138: 5–109.

Zosky GR, Sly PD., 2007. Animal models of asthma. Clin Exp Allergy, 37: 973-88.

9 Anhang

9.1 Abkürzungs- und Formelverzeichnis

Δ	Delta
Abb.	Abbildung
Abs.	Absatz
AHR	Atemwegshyperreagibilität
Ak	Antikörper
Al(OH ₃)	Aluminiumhydroxid
ANOVA	Ananalysis of Variance between groups
ARDS	Akute Respiratory Distress Syndrom, akutes Lungenversagen
C57BL6-Tiere	C57BL6-Mäusestamm (Black six)
BAL (F)	Bronchoalveolare Lavage (Flüssigkeit)
Bet v 1a	Birkenpollenallergen
BMFZ	Biomedizinisches Forschungszentrum
CO ₂	Kohlendioxid
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
CT-Wert	Threshold Cycle (PCR-Messung)
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dpa	Deutsche Presse Agentur
EDN	Equivalent Degrees of Nitration, Nitrationsgrad
ELF	Epithelial Lining Fluid (epitheliale Schleimschicht)
g	Gravitation/x-faches der Erdbeschleunigung ($1g \approx 9,81 \text{ m/s}^2$)
GPX 1-4	Glutathionperoxidasen 1-4
GR	Glutathionreduktase

GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion-Disulfid
h	Hora/ Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazine-N-2-Ethansulfonsäure
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Ig	Immunglobulin (gefolgt von Buchstabe)
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin (gefolgt von Zahl)
iNOS	induzierbare NO-Synthase
i.p.	intraperitoneal
KLH	Keyhole Limped Hemocyanin
LDH	Laktatdehydrogenase
MCh	Methacholin (Acetyl-Methylcholine Chloride)
MHC	Major Histocompatibility Complex
mV	Millivolt
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Versuchstiere/ Tierproben
nBet v 1a	nitriertes Birkenpollenallergen
NaCl	Natriumchlorid
nKLH	nitriertes Keyhole Limped Hemocyanin
NO	Stickstoffmonoxid, Nitroxid
NOS	NO-Synthase
NO ₂	Stickstoffdioxid
nOVA	nitriertes Ovalbumin
nPT	nitriertes Polytyrosin
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ^{•-}	Superoxidanionradikal
O ₃	Ozon
ONOO ⁻	Peroxinitrit

OVA	Ovalbumin (Albumin des Eiklars)
PBS	Phosphate Buffer Solution
PCR	Polymerasekettenreaktion
PM	particulate matter, Feinstaub
ppm	parts per million
PT	Polytyrosin
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	Reaktive Nitrospezies
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT-qPCR	Real-time, quantitative PCR
SEM	Standard Error of the Mean, Standardfehler
Tab.	Tabelle
T _H 1	T-Helferzellen-1
T _H 2	T-Helferzellen-2
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Treg	regulatorische T-Zelle
V	Volt
WHO	World Health Organisation

9.2 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

9.2.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 10:	Übersicht der weltweiten Asthmaprävalenz	1
Abbildung 11:	Regulation von T_H2 -Zellen, Zytokinen und anderen Faktoren, welche die Immunreaktion beeinflussen.....	3
Abbildung 12:	Verbildlichung der Hygiene-Hypothese und des möglichen Einflusses früher Infektionen auf die Entwicklung der Immunantwort.....	5
Abbildung 13:	Schematische Darstellung des Nitrierungsvorgangs der Aminosäure Tyrosin anhand der Strukturformeln	10
Abbildung 14:	Die von der Glutathionperoxidase bzw. Glutathionreduktase katalysierten Reaktionen, schematische Darstellung.....	14
Abbildung 15:	Schematische Darstellung des Versuchsablaufs.....	31
Abbildung 16:	Operation zur Typ-II-Zell- und Lavage-Gewinnung.....	34
Abbildung 17:	Gesamtzellzahlen in Zytospinpräparaten der C57BL6-Versuchsgruppen.....	51
Abbildung 18:	Prozentuale Anteile der Makrophagen und eosinophilen Granulozyten in Zytospinpräparaten der C57BL6-Tiere.....	52
Abbildung 10:	Prozentuale Anteile der Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten in Zytospinpräparaten der C57BL6-Tiere.....	53
Abbildung 11:	Repräsentative Zytospinpräparat-Ansichten (BAL) der C57BL6-Tiere	54
Abbildung 12:	Proteingehalt der BAL-Flüssigkeit verschiedener Versuchsgruppen der C57BL6-Tiere.....	55

Abbildung 13:	Repräsentative Ansichten von histologischen Präparaten PBS/PBS behandelter C57BL6-Tiere.....	56
Abbildung 14:	Repräsentative Präparatansichten der C57BL6-Versuchs- gruppen OVA/OVA und nOVA/nOVA.....	58
Abbildung 15:	Repräsentative Präparatansichten der C57BL6- Versuchsgruppen nOVA/nKLH und nKLH/nKLH.....	59
Abbildung 16:	Typ-II-Zell-Proteingehalt ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) der C57BL6-Tiere.....	60
Abbildung 17:	Negativkontrolle und Positivkontrolle für die immunhistologische Färbung bei C57BL6-Tieren.....	61
Abbildung 18:	Immunhistologischer Nachweis von Glutathionreduktase bei C57BL6-Versuchsgruppen.....	63
Abbildung 19:	Nachweis der GR mittels Western Blot unter Verwendung von Typ-II-Zell-Proteinproben der C57BL6-Tiere.....	63
Abbildung 20:	m-RNA-Expression der Glutathionreduktase verschiedener C57BL6-Versuchsgruppen.....	64
Abbildung 21:	Immunhistologischer Nachweis von Glutathionperoxidase 3 bei C57BL6-Versuchstieren.....	66
Abbildung 22:	Nachweis von Gpx 3 durch Western Blot unter Verwendung von Typ-II-Zell-Proteinproben der C57BL6- Tiere.....	66
Abbildung 23:	Nachweis von GPX3 durch Western Blot unter Verwendung von Typ-II-Zell-Proteinproben der C57BL6- Tiere.....	67
Abbildung 24:	m-RNA-Expression der Glutathionperoxidase 3 verschiedener C57BL6-Versuchsgruppen.....	67
Abbildung 25:	Immunhistologischer Nachweis von Glutathionperoxidase 4 bei C57BL6-Tieren.....	68

Abbildung 26:	m-RNA-Expression der Glutathionperoxidase 4 verschiedener C57BL6-Versuchsgruppen	69
Abbildung 27:	Gesamtzellzahlen in Zytospinpräparaten der BALB/c- Versuchsgruppen	71
Abbildung 28:	Prozentuale Anteile der Makrophagen und eosinophilen Granulozyten in Zytospinpräparaten der BALB/c-Tiere.....	72
Abbildung 29:	Repräsentative Zytospinpräparat- Aufnahmen (BAL) der BALB/c-Tiere	73
Abbildung 30:	Proteingehalt der BAL-Flüssigkeit der BALB/c- Versuchsgruppen	74
Abbildung 31:	Repräsentative histologische Präparatausschnitte (BALB/c-Tiere).....	77
Abbildung 32:	Typ-II-Zell-Proteingehalt ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) der BALB/c-Tiere.....	77
Abbildung 33:	Negativkontrolle und Positivkontrolle der Immunhistologie mit BALB/c-Tieren	78
Abbildung 34:	Immunhistologischer Nachweis der Glutathionreduktase bei BALB/c-Tieren verschiedener Versuchsgruppen	79
Abbildung 35:	Immunhistologischer Nachweis der Glutathionreduktase bei BALB/c-Tieren verschiedener Versuchsgruppen	80
Abbildung 36:	Nachweis von Glutathionreduktase in Typ-II- Zellproteinproben (BALB/c-Tiere) mittels Western Blot	80
Abbildung 37:	Nachweis von Glutathionreduktase in Typ-II- Zellproteinproben (BALB/c-Tiere) mittels Western Blot.....	81
Abbildung 38:	m-RNA-Expression der Glutathionreduktase bei BALB/c- Tieren verschiedener Versuchsgruppe	81
Abbildung 39:	Immunhistologischer Nachweis von Glutathionperoxidase 3 bei BALB/c-Tieren verschiedener Versuchsgruppen	82

Abbildung 40:	Immunhistologischer Nachweis von Glutathionperoxidase 3 bei BALB/c-Tieren verschiedener Versuchsgruppen	83
Abbildung 41	Nachweis von GPX 3 in Typ-II-Zellproteinproben (BALB/c-Tiere) mittels Western Blot.....	83
Abbildung 42:	Nachweis von GPX 3 in Typ-II-Zellproteinproben (BALB/c-Tiere) mittels Western Blot.....	84
Abbildung 43:	m-RNA-Expression der Glutathionperoxidase 3 bei vorbehandelten BALB/c-Tieren	84
Abbildung 44:	Immunhistologischer Nachweis von Glutathionperoxidase 4 bei BALB/c-Tieren	85
Abbildung 45:	m-RNA-Expression der Glutathionperoxidase 4 bei BALB/c-Tieren verschiedener Versuchsgruppen.....	85

9.2.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2:	Behandlungsschema der C57BL6 Tiere.....	29
Tabelle 2:	Behandlungsschema der C57BL6 Tiere	30
Tabelle 3:	Behandlungsschema der BALB/c-Tiere.....	30
Tabelle 4:	Primär-Antikörper und eingesetzte Verdünnung für die die Enzym-Detektion mittels Immunhistologie.....	40
Tabelle 5:	Primär-Antikörper und eingesetzte Verdünnungen für die Enzym-Detektion mittels Western Blot.....	45

9.3 Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

Auswirkung der Nitrierung von Allergenen und von nitriertem Polytyrosin auf die Entwicklung einer akut entzündlichen Atemwegsreaktion am Mausmodell

in der Abteilung für Pneumologie unter Leitung von Prof. Dr. C. Vogelmeier mit Unterstützung des Institutes für Pathologie und der Abteilung für Klinische Chemie ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Ein Teil der Ergebnisse unter Verwendung von C57BL6-Tieren wurde in einem Abstract zur Jahrestagung der *American Thoracic Society (ATS)* in New Orleans mit dem Titel „Allergen nitration potentiates allergic immune responses“ im Jahr 2010 veröffentlicht.

Nauklyar

Köln, 15.4.2012

9.4 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren bzw. Privatdozenten

- der Philipps-Universität Marburg:

Aumüller, Barth, Basler, Baum, Baumann, Czubayko, Daut, Dettmeyer, Eilers, Feuser, Fuchs-Winkelmann, Gerdes, Görg, Gress, Grundmann, Herrmann-Lingen, Höffken, Jungclas, Klose, Koolmann, Krieg, Kroll, Lang, Lenz, Lill, Lohoff, Löffler, Maier, Maisch, Mandic, Mandrek, Martin, Moll, Morin, Mueller, Mutters, Neubauer, Oertel, Opitz, Plant, Ramaswamy, Renz, Richter, Röper, Schade, Schäfer, Schmidt, Schneider, Schrader, Steiniger, Torossian, Vogelmeier, Wagner, Waldegger, Weihe, Werner, Westermann, Wulf

- der Queen Mary's University, London:

Abraham, Hughes, Moir, Patel, Sharma

9.5 Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Bernd Müller für die Vergabe des vielseitigen Dissertationsthemas, sowie für die Mittel und Möglichkeiten in seinem Labor zu arbeiten und sein allzeit großes Engagement.

Ich danke Frau Dr. Renate Hochscheid sehr für ihre geduldige wissenschaftliche Beratung und Unterstützung.

Frau Elke Kotte möchte ich nicht nur für die Einarbeitung in die Laborarbeit, sondern auch herzlich für ihre langjährige große Hilfe und Flexibilität bei der Versuchskoordination sowie der Durchführung der Experimente danken.

Dank für viele gute Ratschläge, ihre Mithilfe und Motivation gebührt auch Frau Nicole Schreiber.

Meiner Mitdotorandin danke ich ganz herzlich für die gegenseitige Unterstützung und die Kollegialität.

Den Arbeitsgruppen um Herrn Prof. Dr. Moll, Herrn Dr. Garn, Herrn Prof. Dr. Kann und Herrn Prof. Dr. Dr. Bals, im speziellen Frau Püchner, Herrn Kotke und Frau Motzny danke ich für ihre Hilfsbereitschaft, die freundlichen Ratschläge und für die Bereitstellung ihrer Räumlichkeiten und Laborgerätschaften.

Herrn Teich und Frau Kilic danke ich für ihre uneigennützte Hilfe bei den Lungenfunktionsmessungen.

Von Herzen möchte ich meinen Eltern für die ausdauernde Unterstützung danken, nicht nur bei der Fertigstellung der Promotion, sondern während meines gesamten Studiums. Nicht zuletzt danke ich meiner Schwester und ihrer Familie, meinem Partner Daniel Krenski und meinen Freunden für die Begleitung auf dem Weg zur Promotion und ihre aufmunternde Unterstützung in schwierigen Zeiten.